

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA in:

Ecologia Microbica e Resistenza Indotta ad Agenti Fitopatogeni e
Colture Erbacee

Progetto n°2: Resistenza Indotta ad Agenti Fitopatogeni

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: AREA07 AGR/12

**RISPOSTE DI RESISTENZA A BATTERI FITOPATOGENI DI
IMPORTANTI SPECIE COLTIVATE INDOTTE DA MOLECOLE
SEGNALE DI DIVERSA NATURA**

Presentata da: Dr. Enrico Biondi

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Paolo Bertolini

Prof. Umberto Mazzucchi

Esame finale anno 2008

A mio padre

“The truth is rarely pure and never simple”

O. Wilde

ABSTRACT

A modern management of crop protection should be based on integrated control programmes, including the use of environmentally safe products. Antagonistic/beneficial bacteria and resistance inducers may have a great potential in the prophylaxis of diseases caused by common and quarantine pathogens. This work was carried out to confirm the ability of the known strain IPV-BO G19 (*Pseudomonas fluorescens*) against fire blight (*Erwinia amylovora*), as well as to evaluate their efficacy against southern bacterial wilt of tomato (*Ralstonia solanacearum*) and grapevine crown gall (*Agrobacterium vitis*). A virulent strain of *R. solanacearum* race 3 was inhibited by the antagonist on plate. When the pathogen was inoculated 48 h after their application to the root apparatus of tomato plants grown in a climatic chamber, bacterial wilt progression rate was clearly reduced. Moreover the defence response evoked by IPV-BO G19 was studied in tomato plants by monitoring the transcription of genes codifying for three PRs as PR-1a, PR-4, PR-5 and for an intracellular chitinase using multiplex RT-PCR and Real Time RT-PCR. In two field trials during 2005 and 2006, the strain IPV-BO G19 was compared with biofungicides and some abiotic elicitors to protect actively growing shoots of pear scions against fire blight. In both trials, IPV-BO G19 plus Na-alginate gave a high level of protection, three weeks after wound inoculation with *E. amylovora*. In pear leaf tissues treated with the antagonistic strain IPV-BO G19, catalase, superoxyde dismutase and peroxidase activity was evaluated as markers of induced resistance. The IPV-BO G19 strain was compared with other bioagents and resistance inducers to prevent grapevine crown gall under glasshouse and vineyard conditions.

INDICE

CAPITOLO I

LA RESISTENZA INDOTTA AD AGENTI FITOPATOGENI

1. Concetti generali	Pag. 14
1.1. Segnali per la risposta della pianta	Pag. 17
1.1.1. Elicitori esogeni	Pag. 17
1.1.2. Elicitori endogeni	Pag. 19
1.2. Risposta di ipersensibilità	Pag. 21
2. Meccanismi coinvolti nella resistenza sistemica acquisita (SAR)	Pag. 23
2.1. Modificazioni della parete cellulare	Pag. 23
2.2. Proteine da patogenesi (PRs)	Pag. 24
2.3. Stress ossidativo nell'interazione pianta-patogeno	Pag. 25
2.4. Fitoalessine	Pag. 27
3. Microorganismi patogeni e piante: tipologie di interazione	Pag. 29
3.1. Avirulenza: geni e loro prodotti	Pag. 31
3.2. Proteine Avr simili a proteasi nel contesto	

della difesa della pianta	Pag. 33
4. Sistema di traduzione del segnale per l'espressione della resistenza indotta	Pag. 34
5. BIBLIOGRAFIA	Pag. 37

CAPITOLO II

INDUTTORI DI RESISTENZA

1. INTRODUZIONE	Pag. 50
2. Induttori biotici	Pag. 51
2.1. Oligosaccaridi batterici (OLS)	Pag. 54
2.2. Lipopolisaccaridi batterici (LPS)	Pag. 56
3. Induttori abiotici di tipo chimico	Pag. 57
3.1. Principali induttori chimici	Pag. 58
3.1.1. Fosetil-Al	Pag. 58
3.1.2. Acidi nicotinici e benzotidiazoli	Pag. 58
3.1.3. Acido amino butirrico (BABA)	Pag. 60
3.1.4. Prohexadione-Ca (ProCa)	Pag. 61
4. BIBLIOGRAFIA	Pag. 64

FINALITA' DELLA TESI	Pag. 72
-----------------------------	----------------

CAPITOLO III

EFFICACIA DEL CEPPPO IPV-BO G19 NEI CONFRONTI DI

R. solanacearum

1. INTRODUZIONE	Pag. 74
2. MATERIALI E METODI	Pag. 75
2.1. Saggi <i>in vitro</i>	Pag. 75
2.2. Meccanismi d'azione	Pag. 76
2.3. Verifica di produzione di 2,4 DAPG e PCA	Pag. 78
2.3.1. Estrazione DNA	Pag. 78
2.3.2. Saggio PCR	Pag. 79
2.4. Esperimenti in serra	Pag. 80
2.4.1. Materiale vegetale usato negli esperimenti, trattamenti, inoculazioni e rilievi	Pag. 80
3. RISULTATI	Pag. 82
3.1. Esperimenti <i>in vitro</i>	Pag. 82
3.2. Meccanismi d'azione	Pag. 82
3.3. Verifica di produzione di 2,4 DAPG e PCA	Pag. 82
3.4. Esperimenti in serra	Pag. 84
4. DISCUSSIONE	Pag. 90

CAPITOLO IV

STUDIO MOLECOLARE DELLE RISPOSTE DI DIFESA IN POMODORO

1. INTRODUZIONE Pag. 96

1.1. Proteine da patogenesi (PRs) associate alle
risposte di difesa della pianta Pag. 96

1.2. Famiglie di PRs Pag. 99

1.2.1. PR-1 Pag. 99

1.2.2. PR-2 Pag. 100

1.2.3. PR-3 Pag. 100

1.2.4. PR-4 Pag. 101

1.3.5. PR-5, proteine simili alla Taumatina (TLPs) Pag. 101

1.3.6. PR-6 e PR-7 Pag. 102

1.3.7. PR-8 e PR-11 Pag. 103

1.3.8. PR-9 Pag. 103

1.3.9. PR-10 Pag. 103

1.3.10. PR-12, PR-13, Pr-14 Pag. 104

1.3.11. PR-15 e PR-16 Pag. 104

1.3.12. PR-17	Pag. 105
2. MATERIALI E METODI	Pag. 105
2.1. Materiale vegetale, esperimenti in cella climatica, raccolta campioni	Pag. 105
2.2. Estrazione RNA totale	Pag. 107
2.3. Digestione con DNasi	Pag. 109
2.4. Controllo della qualità del RNA mediante gel elettroforesi	Pag. 110
2.5. Determinazione quantitativa dell'RNA totale	Pag. 111
2.6. Analisi dell'espressione genica della pianta	Pag. 111
2.6.1. Uso del controllo endogeno per quantificare il livello di RNA messaggero	Pag 112
2.6.2. Saggio dell'espressione genica mediante RT-PCR	Pag. 112
2.6.3. Estrazione della banda da gel	Pag. 116
2.6.4. Clonaggio dei prodotti PCR	Pag. 117
2.6.4.1. Preparazione delle cellule competenti di <i>Escherichia coli</i> (ceppo JM 109)	Pag. 117
2.6.4.2. Reazione di ligasi e trasformazione mediante kit pGEM-T Easy Vector System (Promega)	Pag. 118
2.6.4.3. Estrazione del plasmide ricombinante	Pag. 122
2.6.4.4. Digestione del plasmide ricombinante con <i>EcoRI</i>	Pag. 123

2.6.4.5. Sequenziamento dell'amplicone clonato	Pag. 124
2.6.4.6. Disegno primer per Real Time PCR e loro messa a punto	Pag. 124
2.6.4.7. Real Time PCR	Pag. 125
3. RISULTATI	Pag. 127
3.1. Saggio su espressione genica mediante RT-PCR dopo il trattamento con IPV-BO G19	Pag. 129
3.2. Sequenziamento dell'amplicone clonato ed allineamento con sequenze note	Pag. 131
3.3. Saggio su espressione genica mediante Real Time PCR dopo il trattamento con IPV-BO G19	Pag. 136
4. DISCUSSIONE	Pag. 138
5. BIBLIOGRAFIA	Pag. 142

CAPITOLO V

EFFICACIA DI ELICITORI ABIOTICI E DEL CEPPPO IPV-BO G19 NEI CONFRONTI DI *E. amylovora* ED INDAGINE SULLE RISPOSTE DI DIFESA DEL PERO

1. INTRODUZIONE	Pag. 151
2. MATERIALI E METODI	Pag. 153

2.1. Approntamento del biopreparato a base di IPV-BO G19	Pag. 153
2.2. Esperimenti in serra: sopravvivenza sulle foglie di IPV-BO G19	Pag. 153
2.2.1. Materiale vegetale usato, trattamenti e rilievi	Pag. 154
2.3. Esperimenti in campo	Pag. 154
2.3.1. Materiale vegetale usato, trattamenti, inoculazione e rilievi	Pag. 154
2.4. Esperimenti in serra: valutazione dell'espressione di CAT, SOD e POD	Pag. 157
2.4.1. Materiale vegetale, trattamenti e raccolta campioni	Pag. 157
2.4.2. Estrazione enzimatica	Pag. 157
2.4.3. Saggio per attività catalasica (CAT)	Pag. 158
2.4.4. Saggio per attività perossidasi (POD)	Pag. 158
2.4.5. Saggio per superossidodismutasi (SOD)	Pag. 159
2.4.6. Proteine totali ed elaborazione statistica	Pag. 160
3. RISULTATI	Pag. 160
3.1. Esperimenti in serra: sopravvivenza sulle foglie di IPV-BO G19	Pag. 160
3.2. Esperimenti in campo	Pag. 161
3.3. Esperimenti in serra: valutazione dell'espressione di CAT, SOD e POD	Pag. 165

4. DISCUSSIONE	Pag. 168
----------------	----------

5. BIBLIOGRAFIA	Pag. 170
-----------------	----------

CAPITOLO VI

EFFICACIA PROTETTIVA DI ELICITORI ABIOTICI E DI BATTERI ANTAGONISTI NEI CONFRONTI DI *Agrobacterium* *vitis* AGENTE DELLA ROGNA DELLA VITE

1. INTRODUZIONE	Pag. 175
-----------------	----------

2. MATERIALI E METODI	Pag. 176
-----------------------	----------

2.1. Esperimento in serra	Pag. 176
---------------------------	----------

2.2. Esperimento in campo	Pag. 179
---------------------------	----------

3. RISULTATI	Pag. 181
--------------	----------

3.1. Esperimento in serra	Pag. 181
---------------------------	----------

3.2. Esperimento in campo	Pag. 182
---------------------------	----------

4. DISCUSSIONE	Pag. 184
----------------	----------

5. BIBLIOGRAFIA	Pag. 186
-----------------	----------

CONCLUSIONI	Pag. 192
--------------------	-----------------

APPENDICE	Pag. 194
------------------	-----------------

CAPITOLO I

LA RESISTENZA INDOTTA AD AGENTI FITOPATOGENI

1. Concetti generali

Le piante sono costantemente esposte al rischio di ammalarsi. Nel corso dell'evoluzione, le piante hanno acquisito la capacità di distinguere il self dal non self e di attivare efficaci barriere di difesa nei confronti di simbionti potenzialmente patogeni. D'altra parte, coevolvendo con la pianta ospite, una minoranza di simbionti ha acquisito la capacità di prevenire o menomare le sue barriere di difesa dando luogo ai patosismi. Il patosismo ha luogo quando il simbionte danneggia l'ospite sino anche ad ucciderlo e diviene patogeno. Risultati del patosismo sono lo stato di malattia a carico della pianta e l'attributo di patogeno per il simbionte. Le piante ospiti però non rimangono passive durante l'interazione parassitaria, ma avviano un ricco arsenale di barriere di difesa. Le barriere possono essere passive o precostituite oppure attive o postinfettive: sono passive ad esempio, la spessa cuticola cerosa ed idrofobica di foglie e frutti che fungono da barriera fisica, stomi con aperture assai esigue e dotate di estroflessioni protettive, incrostazione ed adcrostazioni rispettivamente di lignina e suberina nelle pareti delle cellule vegetali, riserve di composti antimicrobici di varia natura, strategicamente dislocati ed idonei a prevenire la colonizzazione tissutale. Le barriere attive o postinfettive sono attivate una volta avvenuto il contatto con il patogeno. Nella difesa attiva, si mette in moto una serie di eventi metabolici che

modificano lo stato fisiologico della pianta e la rendono più pronta a far fronte agli “invasori”. Le modificazioni riguardano sia il rafforzamento dei meccanismi analoghi a quelli della difesa passiva, sia la attuazione di risposte di altra natura inclusa la morte cellulare. Si può affermare che, in natura, l’immunità è la regola mentre la malattia è l’eccezione: si instaura la malattia quando il patogeno riesce a superare tutti i meccanismi di difesa passiva dell’ospite e ad evitare che vengano attivate precocemente le risposte attive.

Quando le risposte di difesa attivate sono tali da bloccare il patogeno, le interazioni pianta-patogeno vengono definite omologhe incompatibili (Hutcheson, 1998); quando invece la pianta si ammala a seguito di patogenesi, si parla di interazioni omologhe compatibili. Comunque, il potenziale genetico per la creazione delle barriere di difesa è comune sia alle piante resistenti che a quelle suscettibili; ciò che le differenzia sembra essere collegato alla rapidità ed alla consistenza della risposta. I primi eventi che regolano la rapidità della risposta e definiscono l’esito dell’interazione sono definiti di ‘riconoscimento’ e si riferiscono all’abilità della pianta di riconoscere subito il patogeno come qualcosa di estraneo e quindi di rispondere adeguatamente. Di conseguenza, un’interazione omologa incompatibile è la risultante di una rapida risposta dell’ospite e della successiva resistenza; al contrario un’interazione omologa compatibile è contraddistinta da una risposta ritardata nel tempo e quindi dall’incapacità dell’ospite nell’attuare tempestivamente tutto il potenziale difensivo di cui dispone (Lusso e Kuc, 1999).

Per quanto riguarda le piante resistenti si può parlare di tre differenti classi di risposte attive di difesa: primarie, secondarie e terziarie. Le risposte primarie sono localizzate solo nelle cellule che

vengono a diretto contatto con il patogeno e si manifestano come necrosi localizzata del tessuto risultato di morti cellulari programmate; la necrosi blocca l'ulteriore avanzamento del patogeno creando condizioni non più adatte alla sua crescita nei tessuti. Le risposte secondarie si hanno nelle cellule adiacenti a quelle interessate dalle risposte primarie e sono indotte da segnali generati da queste ultime e giunti nelle aree limitrofe a dove è avvenuto l'attacco del patogeno (LAR = Resistenza Localizzata Acquisita). L'ultima categoria di risposte di difesa interessa la pianta *in toto*. Segnali generati dalla risposta primaria si sono diffusi in altre parti della pianta ed hanno attivato ulteriori sistemi di difesa e per questo motivo si parla di **resistenza sistemica acquisita (SAR)**.

L'induzione delle risposte attive, implica che le piante sono in grado di riconoscere uno o più stimoli derivanti da un patogeno invasore durante le prime fasi dell'interazione e, successivamente, di rispondere in maniera adeguata per farvi fronte. Da ciò si deduce che le cellule vegetali possiedono un sistema di sorveglianza che è capace di rilevare immediatamente i segnali generati sin dai primi momenti di interazione col patogeno e di attivare altrettanto prontamente adeguate risposte di difesa. La chiave che porta all'insieme degli eventi concernenti la risposta di difesa attiva della pianta è il riconoscimento del patogeno da parte della cellula vegetale nella fase di risposta primaria. Modelli tradizionali, elaborati per spiegare l'interazione ospite-patogeno, hanno ipotizzato il verificarsi di eventi di riconoscimento gene specifici tra molecole fungenti da recettori della cellula vegetale e molecole segnale prodotte dal patogeno. Le molecole segnale, in grado di attivare le risposte di difesa, sono chiamati **elicitori**, cioè molecole "provocatrici". Il rapido riconoscimento degli elicitori dà luogo all'incompatibilità e quindi alla resistenza. È stato

rilevato che le cellule vegetali possiedono una serie di sistemi di sorveglianza localizzati in diversi compartimenti cellulari capaci di captare diverse classi di elicitori; alcuni di questi sistemi di ricezione sono siti nell'apoplasto, altri risultano avere sede nel citoplasma e nel nucleo (Hutcheson, 1998).

1.1. Segnali per la risposta della pianta

L'induzione delle risposte di difesa richiede la percezione di segnali da parte della pianta, derivanti sia dal patogeno (esogeni) sia dalla pianta stessa (endogeni).

1.1.1. Elicitori esogeni

Uno dei primi elicitori esogeni ad essere stato caratterizzato è il polipeptide monilicolina A, dal micelio del fungo *Monilia fructicola*, capace di indurre l'accumulo della fitoalessina faseollina in piante di fagiolo (Cruickshank e Perrin, 1968). Per fitoalessine si intendono sostanze antimicrobiche prodotte dalla pianta in seguito a stimoli di diversa natura, compreso l'attacco di patogeni. Un altro elicitore identificato è il glucano dell'oomicete *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, inducente la produzione della fitoalessina gliceollina in soia (Sharp *et al.*, 1984; Ham *et al.*, 1991). Altri elicitori proteici sono stati caratterizzati nel genere *Phytophthora*. Essi includono proteine isolate da *P. capsici* e *P. cryptogea* in grado di indurre necrosi ed attivare enzimi nel ciclo metabolico delle fitoalessine sesquiterpenoidi, quando sono

introdotte in piante di tabacco o usate per trattare colture cellulari di tabacco (Ricci *et al.*, 1989, Chappel *et al.*, 1997).

Un altro gruppo di elicitori è rappresentato da molecole glucidiche, comprendenti chitosano ed altri frammenti derivanti dalla chitina, componente della parete cellulare dei funghi, rilasciato in seguito all'azione di chitinasi e chitosanasi (Walker-Simmons *et al.*, 1983; Kohle *et al.*, 1984). Gli oligomeri di chitina e chitosano, isolati dai patogeni *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *F. moniliforme* inducono, rispettivamente, accumulo di fitoalessine e lignina in piante di pisello e riso (Hadwiger e Beckman, 1980; Ren e West, 1992).

Un'altra categoria di elicitori è quella degli acidi grassi. Gli acidi arachidonico ed eicosapentenoico di *P. infestans* stimolano la produzione di fitoalessine sesquiterpenoidi in tuberi di patata (Zook e Kuc, 1991) ed inducono una risposta sistemica nelle foglie di patata contro tale patogeno (Cohen *et al.*, 1991); in foglie di fagiolo, gli acidi arachidonico e linoleico inducono la sintesi di fitoalessine isoflavonoidi (Longland *et al.*, 1987), mentre in colture cellulari di pepe verde l'acido arachidonico induce accumulo dei sesquiterpenoidi capsidiolo e riscitina (Hoschino *et al.*, 1994).

Elicitori esogeni sono stati individuati anche in virus e batteri fitopatogeni (Culver e Dawson, 1991). Uno di questi è l'arpina ("Harpin_{Ea}"), un polipeptide ricco di glicina, secreto dal batterio Gram negativo *Erwinia amylovora*, agente causale del colpo di fuoco batterico delle rosacee; se infiltrata in foglie di tabacco (interazione eterologa), è in grado di indurre risposta di ipersensibilità (Hypersensitive Response, HR), una rapida necrosi localizzata del tessuto vegetale che ostacola l'ancoramento e la successiva colonizzazione tissutale da parte del patogeno. Un'altra arpina è stata

isolata dal batterio *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (“Harpin_{PSS}”) ed anch’essa è in grado di indurre HR in foglie di tabacco. È interessante notare che tali elicitori proteici sono codificati dal complesso genico *hrp* (*hypersensitive response pathogenicity*) e possono essere considerate molecole segnale critiche per l’evoluzione della patogenesi avviata dai ceppi virulenti nell’ospite naturale e, contemporaneamente, inducenti HR in piante non ospiti. Ciò suggerisce che il medesimo meccanismo molecolare, perciò le medesime molecole, controlla sia la patogenicità sia la resistenza nelle diverse interazioni che si espletano fra pianta e batterio (Lusso e Kuc, 1999).

Durante l’infezione virale è stato ipotizzato che le proteine virali siano i più probabili segnali riconosciuti dalla pianta come estranei e che quindi rappresentino gli elicitori delle risposte di resistenza. Nel caso del virus del mosaico del tabacco (TMV), ad esempio, la replicasi è stata proposta come induttore di risposte di difesa in linee di tabacco, contenente all’interno del suo corredo cromosomico, il gene N, che conferisce resistenza e che deriva da *Nicotiana glutinosa*, mentre in linee di tabacco aventi il gene non allelico N’, derivato da *N. sylvestris*, la proteina di rivestimento di alcuni ceppi di TMV agisce da elicitore (Hutcheson, 1998).

1.1.2. Elicitori endogeni

Gli elicitori endogeni sono molecole di origine vegetale rilasciate durante il processo patogenetico. Per il momento, gli unici elicitori individuati sono quelli rilasciati dalla parete della cellula vegetale in seguito a degradazione da parte di enzimi litici attivi i polisaccaridi e

acidi poligalatturonici componenti della parete cellulare (Hofius *et al.*, 2007). I residui ottenuti dall'azione di questi enzimi possono fungere da molecole stimolanti risposte di resistenza. Nel fungo zigomicete *Rhizopus stolonifer*, è stata isolata una endopoligalatturonasi che, in semi di fagiolo, causa il rilascio di residui oligalatturonici in grado di indurre la sintesi della fitoalessina terpenoide casbene (Lee e West, 1981). Anche nel fungo mitosporico *Alternaria alternata*, è stata trovata una endopoligalatturonasi con funzioni analoghe (Roco *et al.*, 1993). Un'altra categoria di enzimi verosimilmente in grado di produrre elicitori endogeni è data dalle liasi dell'acido endopoligalatturonico, dalla cui azione vengono rilasciati polisaccaridi pectici derivanti dalla parete vegetale (Davis *et al.*, 1984, 1986; Alghisi e Favaron, 1995). Nel batterio *Pectobacterium carotovorum*, per esempio, è stata isolata una liasi stimolante sia sintesi della fitoalessina pterocarpano nella soia, sia la generazione di elicitori endogeni provenienti dalla parete. (Davis *et al.*, 1984).

Gli acidi oligogalatturonici inducono altri tipi di risposte di difesa, come la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in colture cellulari di soia (Legendre *et al.*, 1993). Queste molecole hanno una duplice funzione nell'ambito della difesa della pianta: il perossido di idrogeno (H_2O_2), prodotto nelle piante sensibilizzate, è in grado, da solo, di rallentare l'avanzata del patogeno (Peng e Kuc, 1992) e da fungere da elicitore endogeno secondario a seguito della formazione di legami intermolecolari tra proteine di parete; il risultato è un irrigidimento della parete stessa da cui deriva una maggiore resistenza alla digestione operata dagli enzimi dei patogeni (Lusso e Kuc, 1999).

1.2. Risposta di ipersensibilità

La risposta di ipersensibilità (HR) è la morte rapida e localizzata delle cellule vegetali in seguito all'attacco di un patogeno eterologo od omologo incompatibile nei confronti dell'ospite. La risposta non permette l'insediamento del patogeno nei tessuti viventi della pianta e vanifica il tentativo di colonizzazione, ed è considerato un importante meccanismo di autodifesa (Lusso e Kuc, 1999). Sono passati ormai oltre 40 anni da quando furono fatte le prime osservazioni su questo fenomeno (Klement, 1963): fu notata resistenza ad infezioni batteriche in quelle piante che evidenziavano necrosi cellulare nel sito in cui il patogeno era stato localmente infiltrato. Tale reazione, successivamente definita risposta di ipersensibilità (Klement *et al.*, 1964), fu inizialmente descritta come una rapida necrosi osservata entro le 24 ore dopo inoculazione del tessuto con un ceppo batterico potenzialmente fitopatogeno, ma incompatibile (Hutcheson, 2001). Sono stati identificati due tipi di interazioni associati alla risposta di ipersensibilità (Klement, 1982):

1. Un patogeno di una specie vegetale interagente con una specie vegetale non-ospite (interazione eterologa);
2. Una razza o pathovar di un patogeno di una specie vegetale interagente con cultivar resistenti della stessa specie (interazione omologa incompatibile, resistenza razza-cultivar specifica di tipo verticale) (Hutcheson, 2001).

È stato provato che la risposta di ipersensibilità rappresenta una linea di difesa assai efficace nei confronti di molti patogeni,

specialmente biotrofici (Goodman e Novacky, 1994; Hutcheson, 1998; Dangl e Jones, 2001; Lam *et al.* 2001).

In generale si può dire che la morte cellulare ha due funzioni fondamentali: privare il patogeno dei nutrienti ed allo stesso tempo creare un ambiente ostile causato dalla disorganizzazione di tutti i compartimenti cellulari (in particolare delle membrane biologiche) seguita dalla fuoriuscita di sostanze ad azione microbica diretta (Levine, 1999). La HR induce altresì la produzione di fitoalessine che possono accumularsi nelle cellule morte ed in quelle limitrofe contribuendo ad arrestare l'avanzata del patogeno (Lusso e Kuc, 1999).

La reazione di ipersensibilità trova molte analogie con la morte cellulare programmata nelle cellule animali (detta anche apoptosi) (Hutcheson, 1998; Collmer *et al.*, 2000; Staskawicz *et al.*, 2001). Nelle cellule vegetali, infatti, è stata notata anche la degradazione del DNA in frammenti oligonucleosomici ("DNA laddering"), esattamente come avviene nell'apoptosi (Ryerson e Heath, 1996).

L'HR è spesso preceduta da mutamenti nel flusso di ioni e formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ad azione letale sullo stesso patogeno. La produzione di un'altra specie reattiva dell'ossigeno, l'acqua ossigenata (H_2O_2), contribuisce al rafforzamento della parete cellulare della pianta, in quanto facilita l'attività delle perossidasi catalizzanti sia la formazione di legami intermolecolari tra componenti strutturali della parete, sia la polimerizzazione della lignina (De Gara *et al.*, 2003). Successivamente si hanno altri eventi coinvolti nelle risposte di difesa della pianta, come l'aumento della quantità di acido salicilico, molecola segnale (ed anche marcatore) per le risposte secondarie di difesa ed attivazione della trascrizione di nuove proteine

antimicrobiche, collettivamente definite proteine da patogenesi (PRs = Pathogenesis Related Proteins).

2. Meccanismi coinvolti nella resistenza sistemica acquisita (SAR)

Sono stati identificati diversi fattori coinvolti resistenza all'attacco degli agenti patogeni dopo stimolazione della pianta con elicitori.

2.1. Modificazioni della parete cellulare

La parete della cellula vegetale rappresenta una delle prime barriere costitutive all'aggressione dei patogeni, che in molti casi riescono a degradarla con enzimi specifici come pectinasi, cellulasi, xilanasi e poligalatturonasi. Le piante possono rispondere all'infezione in corso fortificando la parete cellulare rendendola così più resistente alla degradazione enzimatica e, di conseguenza, ostacolare l'avvio della patogenesi e bloccare la diffusione dei nutrienti dalla cellula vegetale nell'apoplasto a vantaggio del microrganismo; oltre ai nutrienti, la parete più spessa ritarda la diffusione di sostanze fitotossiche dal patogeno alla pianta, fattore che può avere un ruolo essenziale per le patogenesi avviate da patogeni necrotrofici o tossigenici (Lusso e Kuc, 1999).

I cambiamenti a carico della parete cellulare includono la deposizione di callosio, formazione di papille, lignificazione, formazione di legami crociati con proteine strutturali come

glicoproteine ricche in idrossiprolina (HRGP), proteine ricche in prolina (PRP) e proteine ricche in glicina (GRP) (Hammerschmidt e Kuc, 1982).

Incrostazioni di lignina nello spessore della parete, soprattutto nella zona della lamella mediana, sono stati osservati in molte piante a seguito dell'infezione da parte di vari organismi patogeni come virus, batteri, funghi e nematodi; tali evidenze sperimentali sottolineano l'importante funzione della lignificazione come fattore di resistenza. La lignina, polimero idrofobico ad alto peso molecolare di natura aromatica, è originata dalla polimerizzazione di precursori prodotti durante il ciclo dei fenilpropanoidi (via dell'acido scichimico), la cui prima fase è quella della deaminazione della fenilalanina ad acido cinnamico, reazione catalizzata dall'enzima fenilalanina ammonialiasi (PAL). Tale ciclo fornisce precursori anche per altri metaboliti secondari delle piante coinvolti nelle risposte di difesa, come fitoalessine ed acido salicilico (Sticher *et al.*, 1997).

2.2. Proteine da patogenesi (PRs)

Durante lo sviluppo della forma di resistenza sistemica acquisita (SAR) è stata rilevata la produzione di nuove proteine, chiamate nel loro insieme proteine da patogenesi (PRs). Queste proteine sono di origine vegetale e sono associate a situazioni di stress biotici o abiotici (es.: patogeni, stress da sostanze chimiche, da freddo, da insetti, da nematodi, ecc...); è interessante notare che esse si accumulano, non solo localmente nella zona infetta o danneggiata, ma la loro produzione è generalizzata a tutta la pianta. L'induzione delle PRs è stata trovata in

molte specie vegetali e sono state descritte per la prima volta negli anni '70 in foglie di tabacco infettate con TMV (Gianinazzi *et al.*, 1970); inizialmente furono definite come proteine acide resistenti alle proteasi, solubili in ambiente acido e localizzate nel comparto extracellulare (apoplasto). Successivamente ne furono identificate di basiche anche nei vacuoli.

A tutt'oggi, le proteine da patogenesi identificate sono state raggruppate in 17 famiglie, denominate con i numeri da 1 a 17 e si differenziano per la sequenza amminoacidica e la funzione biologica: infatti, sono state identificate chitinasi, glucanasi, endoproteinasi, perossidasi e molte di queste mostrano attività antimicrobica *in vitro*, come varie chitinasi e glucanasi con attività antifungina (Sticher *et al.*, 1997; Van Loon, 2006).

2.3. Stress ossidativo nell'interazione pianta-patogeno

Può essere funzionalmente definito come un eccesso di perossidanti nella cellula, a seguito della riduzione dell'ossigeno O_2 ad acqua: tra queste molecole reattive, vengono annoverati anione o radicale superossido $O_2^{\cdot-}$, perossido di idrogeno H_2O_2 , radicali idrossili OH^{\cdot} e radicale idroperossile HOO^{\cdot} a seguito di protonazione del radicale superossido (Farr e Kogoma, 1991). La produzione di questi intermedi reattivi o specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Intermediates, ROI o Reactive Oxygen Species, ROS) è uno dei primi eventi durante la risposta di ipersensibilità (Dixon *et al.*, 1994). Il radicale idrossile è tra le molecole più reattive nell'ambiente biologico ed è capace di reagire con quasi tutte le macromolecole, quali lipidi, proteine, acidi

nucleici, composti fenolici e zuccheri, modificandone la funzionalità. La proprietà chimica dell'ossigeno di ridursi, accettando con facilità elettroni, fa sì che la produzione di ROS sia costante e spesso eccessiva: di conseguenza, tutti gli organismi viventi devono continuamente intervenire per limitare la produzione di queste molecole dannose mediante attivazione di sistemi antiossidanti. Si ha stress ossidativo quando la loro concentrazione va oltre la capacità naturale della cellula di rimuoverle. Nelle piante, enzimi e metaboliti riducenti agiscono sinergicamente per svolgere la detossificazione da ROS. Enzimi coinvolti più noti sono la superossido dismutasi (SOD), che catalizza la dismutazione di O_2^{\bullet} in H_2O_2 , la catalasi (CAT), che catalizza la trasformazione di H_2O_2 in H_2O e O_2 , la ascorbato perossidasi, avente la medesima funzione, con l'ascorbato quale specifico donatore di elettroni. Il bilancio di attività tra questi tre enzimi è cruciale per determinare il livello di specie reattive presenti. Anche metaboliti riducenti, quali l'ascorbato ed il tripeptide glutathione, proteggono la pianta da stress ossidativo (De Gara *et al.*, 2003).

Come accennato in precedenza, le ROS sono prodotte dalla pianta in risposta a stress biotici ed abiotici; di conseguenza, tali radicali liberi dell'ossigeno sono associati alle prime risposte all'attacco dei patogeni (Levine, 1999). È stato osservato che anche enzimi digestivi secreti da molti funghi, quali cellulasi pectinasi e xilanasi, sono in grado di stimolare una rapida produzione di ROS nella cellula vegetale (Brady e Fry, 1997). In generale, si può affermare che la produzione di ROS si ha in seguito all'attacco di microrganismi patogeni e persino di erbivori (Bi e Felton, 1995).

I processi ossidativi hanno funzioni multiple nella risposta di difesa della pianta. Per prima cosa, pochi minuti dopo l'infezione, essi

provvedono alla necessaria quantità di H_2O_2 per formare i intermolecolari tra proteine della parete cellulare, attraverso reazioni catalizzate da perossidasi. Un'altra funzione è legata all'aumento del livello di H_2O_2 , fungente da messaggero secondario per stimolare ulteriori risposte difensive della pianta. Infine, livelli di concentrazione di ROS oltre certe soglie critiche, innescano nella cellula vegetale il processo di morte cellulare programmata e cioè la risposta di ipersensibilità HR (Levine *et al.*, 1999). Si può parlare di un vero e proprio scoppio ossidativo (oxidative burst), paragonabile a quello che si verifica durante l'attivazione dei macrofagi nel sistema immunitario animale. Queste molecole hanno anche attività antimicrobica diretta. Lo scoppio ossidativo può essere considerato un precoce meccanismo di difesa ed un sistema generatore di segnali per l'attivazione delle successive fasi della resistenza (Dixon *et al.*, 1994).

2.4. Fitoalessine

Molti cambiamenti biochimici si verificano nelle piante dopo l'infezione da parte di un patogeno; un tipo di risposta fortemente associata alla difesa è l'accumulo di particolari molecole, chiamate fitoalessine, definite come composti antimicrobici a basso peso molecolare, prodotti dalla pianta dopo un'infezione (Hammes Schmidt, 1999; Mert-Turk *et al.*, 2003).

Le prime osservazioni concernenti questo fenomeno risalgono al 1911, quando il botanico francese Noel Bernard (Stoessl e Arditì, 1984) scoprì che i tuberi di due specie di orchidee, *Orchis morio* e *Loroglossum hircinum*, diventavano resistenti ad infezioni fungine

dopo essere stati inoculati con il fungo anamorfico *Rhizoctonia repens* (Grayer e Kokubun, 2000). Nel 1940, Muller e Borger osservarono lo stesso fenomeno nei tuberi di patata infettati con un ceppo incompatibile di *Phytophthora infestans*, ottenendo resistenza verso la successiva inoculazione con un ceppo compatibile dello stesso patogeno (Muller e Borger, 1940). Con questo lavoro, essi ipotizzarono che il tessuto del tubero, in risposta all'interazione incompatibile, producesse sostanze non specifiche inibenti l'ulteriore crescita del patogeno e proteggessero anche dall'infezione di altri patogeni compatibili. Tali sostanze furono chiamate fitoalessine e vennero definite composti chimici prodotti in seguito all'invasione della cellula da parte di parassiti (Grayer e Kokubun, 2000). Oltre quindici anni dopo, Muller dimostrò che i semi di baccello di fagiolo infettati con patogeni incompatibili potevano produrre composti fungistatici (Muller, 1958). Questi ed analoghi risultati in diversi laboratori, provarono che le piante inoculate con patogeni incompatibili potevano produrre sostanze antimicrobiche. Nei primi anni '60 fu caratterizzata la prima fitoalessina, la pisatina, estratta da *Pisum sativum* (Cruickshank, 1963). Ben presto divenne evidente che le fitoalessine non venivano prodotte solo dopo infezione con patogeni fungini, ma anche in seguito all'esposizione della pianta ad altri tipi di stress, anche di natura abiotica, come radiazioni UV o trattamenti con ioni di metalli pesanti, quali sali di rame e di mercurio. Nel 1981, venne presentata la seguente definizione generale di fitoalessine: "composti antimicrobici prodotti dopo infezione o stimolazione con agente abiotico" (Paxton, 1981).

Molte fitoalessine sono state identificate e caratterizzate e si è visto che, chimicamente, sono molto diverse, essendo alcune derivate da fenilpropanoidi, altre da flavonoidi e isoflavonoidi ed altre ancora da sesquiterpeni. Sono state rinvenute sia in gimnosperme sia in

angiosperme e, tra queste ultime, sia nelle monocotiledoni che nelle dicotiledoni. È interessante notare che spesso, nell'ambito di una certa famiglia di piante, sono prodotte fitoalessine appartenenti allo stesso gruppo chimico: per esempio, la maggior parte delle fitoalessine prodotte dai membri della famiglia delle crucifere, è rappresentata da indoli contenenti una molecola di zolfo, mentre nella famiglia delle leguminose sono prodotte fitoalessine isoflavonoidi. Possono essere biosintetizzate a partire da uno o più cicli metabolici primari; per esempio, il sesquiterpene capsidiolo è derivato dal ciclo dell'acetato mevalonato, mentre l'alcool coniferilico è prodotto a partire dall'alanina nel ciclo dell'acido scichimico. In alcuni casi, un'unica fitoalessina può derivare da più cicli metabolici, come la gliceollina, che è sintetizzata a partire da precursori provenienti da tre diversi cicli metabolici, acido scichimico, acetato-malonato e acetato-mevalonato (Hammerschmidt, 1999).

3. Microrganismi patogeni e piante: tipologie di interazioni

Le interazioni tra un patogeno e le piante possono essere molteplici secondo le strategie usate dal microrganismo invasore. Alcuni patogeni sono, infatti, non specializzati e uccidono l'ospite producendo tossine e/o enzimi; altri patogeni agiscono in maniera più subdola e raffinata: crescono rispettando l'integrità della cellula ospite, senza causare danni letali nella prima fase della malattia e attivano reazioni assai specifiche. In questo tipo di interazione, i segnali molecolari scambiati tra i partners determinano se l'interazione sarà compatibile o incompatibile. In un'interazione incompatibile il patogeno non esprime virulenza e l'ospite è resistente: ad un primo, rapido evento di riconoscimento

molecolare ne segue un altro di tipo cellulare con la risposta di difesa della pianta. In un'interazione compatibile, invece, l'ospite è suscettibile e il patogeno riesce a superare le sue difese, avviando il processo patogenetico.

Fin dal 1947, il patologo americano Flor riconobbe una precisa base genetica nei diversi modelli di interazione possibili tra una pianta e il suo patogeno. Egli studiò geneticamente sia l'ospite che il patogeno, utilizzando il sistema lino-*Melampsora lini*: venne indagata l'ereditabilità della virulenza (capacità di causare la malattia) e della avirulenza (incapacità di causare malattia in certe cultivars). Flor ottenne degli ibridi tra ceppi di *M. lini* virulenti e avirulenti su una certa cultivar di lino, analizzò la risultante progenie dicariotica, fornendo evidenza della recessività e della dominanza, rispettivamente di virulenza e avirulenza. Questi risultati posero le basi per la nota teoria del "**gene per gene**" governante l'interazione pianta-patogeno: per ogni gene dominante R, determinante resistenza in una pianta, esiste un corrispondente gene dominante di avirulenza nel patogeno (gene Avr). Questa teoria si è successivamente rivelata valida, non solo per interazioni pianta-fungo, ma anche per interazioni pianta-batterio, pianta-virus, pianta-nematode o anche pianta-insetto (Laugé e De Wit, 1998). Essa ha portato ai seguenti risultati: ha reso possibile studiare la resistenza come esito dell'interazione tra i prodotti di geni complementari e scoprire che i geni per la resistenza o per la avirulenza corrispondono a *loci* genici complessi, portando a molteplicità di risposte. Dato che la maggioranza dei geni Avr e R è dominante e probabilmente corrisponde a funzioni positive nell'organismo, è stato usato il modello elicitore-recettore per spiegare la base biochimica del concetto gene per gene: secondo questo modello, uno specifico elicitore (il probabile prodotto del gene Avr) è riconosciuto da un recettore (il

probabile prodotto del gene R) e questa interazione potrebbe attivare una trasduzione del segnale (fase determinativa) che porta alla resistenza attiva nell'ospite (fase espressiva), molto spesso caratterizzata da una risposta di ipersensibilità.

Le interazioni tra pianta e patogeno coinvolgono un esteso e continuo scambio di informazioni che richiedono una regolazione dell'espressione genica, della sintesi proteica di composti speciali, quali le fitoalessine o profonde modificazioni della sintesi di composti parietali (Bonfante P., 1995; Laugé e De Wit, 1998).

3.1. Avirulenza: geni e loro prodotti

In un sistema omologo, l'avirulenza è l'incapacità del patogeno di causare malattia su certe cultivar della specie vegetale ospite. Questa caratteristica del patogeno è codificata da alcuni geni, detti appunto di avirulenza, aventi come prodotti proteine riconosciute da un corrispondente gene di resistenza presente nella pianta.

Nei batteri sono stati individuati diversi determinanti di avirulenza. I geni responsabili presentano le caratteristiche predette dall'ipotesi di Flor: ceppi batterici esprimenti specifici geni di avirulenza Avr sono incompatibili ad ospiti vegetali esprimenti il corrispondente gene di resistenza R. A tutt'oggi, ne sono stati clonati e sequenziati più di 40, la maggior parte da ceppi di *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas* spp. e molti di essi codificano proteine idrofiliche.

Altri studi su batteri fitopatogeni hanno rivelato la presenza di geni coinvolti nell'induzione di resistenza: essi sono stati denominati geni

hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity), ai quali viene in gran parte attribuita attivazione di HR e la patogenicità. Dopo la caratterizzazione di vari clusters di geni *hrp*, è stato trovato che molti dei loro prodotti sono fortemente omologhi alle proteine di sistemi di secrezione di tipo III di agenti zoopatogeni quali *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bordetella*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*. Tali sistemi di natura proteica permettono a questi patogeni di rilasciare ed iniettare proteine batteriche in cellule eucariotiche bersaglio. Alcune di queste proteine secrete ed iniettate nel citosol della cellula ospite fungono da effettori, altre da traslocatori coadiuvanti i primi nell'attraversamento di parete e membrana cellulare eucariotica. Sistemi di secrezione di tipo III esistono anche in batteri fitopatogeni (es: nell'enterobatterio *Erwinia amylovora*) dove sono coinvolti sia nel causare malattia nell'ospite suscettibile, sia nello stimolare HR in piante resistenti o non ospiti. In questi casi, consistono di 15-20 proteine formanti un apparato di secrezione e due gruppi di proteine effettrici: le arpine e le proteine di avirulenza; le prime sono presumibilmente secrete nell'apoplasto e non oltrepassano la membrana citoplasmatica, le seconde sono secrete di regola nel simplasto vegetale.

Le arpine sono state le prime ad essere individuate come proteine traslocate dal sistema di trasporto di tipo III. Queste includono l'arpina HrpN da *Erwinia* spp. HrpW da *E. amylovora* e *P. syringae* e PopA da *Ralstonia solanacearum*; tutte sono stabili al calore, acide, ricche in glicina e prive di cisteina. Le proteine di avirulenza responsabili della specificità di interazione ospite-patogeno sono principalmente riscontrate nei generi *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Il sistema di secrezione III codificato da geni *hrp* risulta fondamentale per permettere alle proteine di avirulenza di essere funzionali (Cornelis e Van Gijsegem, 2000). Infatti, il fenotipo Avr è dipendente da questo

complesso di traslocazione codificato dai geni *hrp*: ceppi mutanti di *P. syringae* e *X. campestris* per i geni *hrp*, non presentano fenotipo Avr. Successivamente, è stato dimostrato che molti geni *avr* sono trascrizionalmente regolati dallo stesso meccanismo dei geni. Supporti sperimentali in tal senso, vengono da prove di espressione di entrambi i geni in batteri eterologhi: facendo esprimere i geni *avr* nel ceppo *E. coli* K12, si è visto che è necessaria la presenza anche dei geni *hrp* per avere il fenotipo Avr. Inoltre, né i geni *avr* né quelli *hrp* da soli sono risultati in grado di permettere al ceppo trasformato di indurre la risposta di ipersensibilità in foglie di *Arabidopsis* o soia. Solo quando i due gruppi di geni sono presenti contemporaneamente nel ceppo trasformato di *E. coli* K12, esso è in grado di indurre HR in quelle piante esprimenti il corrispondente gene di resistenza.

3.2. Proteine Avr simili a proteasi nel contesto della difesa della pianta

E' stato trovato che alcuni geni *avr* presenti in virus, batteri e funghi, codificano proteine simili a proteasi, suggerendo che gli elicitori delle risposte di difesa della pianta possano essere originati da processi proteolitici delle proteine dell'ospite, mediati dai geni *avr*. I prodotti dei geni R della pianta potrebbero, pertanto, essere considerati alla stregua di "guardiani di proteine bersaglio" nella pianta o subire loro stessi dei processi proteolitici. (Bonas e Lahaye, 2002).

4. Sistema di traduzione del segnale per l'espressione della resistenza indotta

L'interazione ospite-patogeno può dar luogo a sviluppo di necrosi ipersensitiva o della reazione normosensitiva. Lo sviluppo di HR è molto rapido ed entro poche ore si assiste ad una serie di aberrazioni della membrana cellulare, come perossidazione dei lipidi, modificazione della concentrazione ionica, con perdita di elettroliti ed ingresso di ioni Ca^{++} e conseguente variazione del potenziale di membrana. Si osserva anche un accentuato metabolismo ossidativo con conseguente produzione di radicali liberi dell'ossigeno; inoltre, vengono attivate anche endonucleasi per la degradazione di DNA e RNA.

Nelle fasi successive della resistenza acquisita si osservano modificazioni più profonde nel metabolismo della pianta ed eventi caratteristici di tale risposta: induzione di geni coinvolti nel ciclo dei fenilpropanoidi, produzione di proteine da patogenesi come chitinasi e β -1,3-glucanasi e di glicoproteine ricche in idrossiprolina. Dato che questi fenomeni sono successivi alla reazione di ipersensibilità, si può ipotizzare che, durante questa prima fase della risposta difensiva della pianta, si producano segnali coinvolti nella stimolazione di risposte secondarie. Come candidati più probabili sono state identificate poche molecole a basso peso molecolare: **acido salicilico (SA)**, **specie reattive dell'ossigeno (ROS)**, **etilene** e **acido giasmonico** ("jasmonic acid", JA) (Hammond-Kosack e Parker, 2003).

Le prime osservazioni circa il possibile ruolo di SA risalgono al 1979, quando White (White, 1979) trovò che, piante di tabacco cv. Xanthi-nc trattate con tale sostanza, manifestavano sintomi da virus del

mosaico TMV assai più attenuati rispetto a quelle di controllo, associati a produzione di PRs. Le sue osservazioni sono state confermate in altri sistemi ed estese ad altri patogeni batterici e fungini. Nel 1983, Van Loon (Van Loon, 1983) per primo ipotizzò la possibilità di una stretta relazione tra SA e SAR ed alcuni anni dopo venne ipotizzato che SA potesse essere il segnale per la SAR; infatti, si osservò un incremento del livello endogeno di SA, sia localmente sia sistemicamente in piante di tabacco dopo inoculazione locale con TMV. Prima dell'espressione di SAR, tale incremento è stato osservato anche nel floema di piante di cetriolo infettate.

L'importanza di SA come segnale nella risposta di difesa della pianta fu documentata usando piante di tabacco e di *Arabidopsis* transgeniche sovraesprimenti il gene per SA-idrossilasi, enzima proveniente dal batterio *Pseudomonas putida*, coinvolto nel metabolismo del naftalene e catalizzante la conversione di SA in catecolo, inattivo come segnale per la SAR. Nelle piante trasformate con questo gene *NahG* (naftalene idrossilasi G), il livello basso di SA e il blocco della SAR indicò che la presenza di SA era richiesta per l'attivazione delle risposte di difesa della pianta (Sticher *et al.*, 1997). Successivi esperimenti hanno messo in luce l'importanza di questa molecola come segnale per indurre risposte locali e sistemiche (Durner *et al.*, 1997). Infatti, SA regola l'espressione di molte PRs, come PR-1 e altre PRs acide, molte delle quali sono idrolasi antifungine (Raymond e Farmer, 1998).

L'acido giasmonico è una molecola a 12 atomi di carbonio derivata dall'acido linoleico (Raymond e Farmer, 1998). E' coinvolto in vari aspetti della biologia della pianta, quali sviluppo del polline e dei semi, difesa contro stress fisici e chimici (ferite, ozono) e stress biotici

(attacco di insetti e di agenti patogeni). L'uso di mutanti di *A. thaliana* non produttori JA, ha permesso di rilevare l'alto livello di suscettibilità a vari patogeni fungini e batterici tra cui *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Pythium* spp. ed *E. carotovora*. Molti geni sono attivati dall'acido giasmonico ed i loro prodotti sono legati all'induzione di resistenza: tra questi, si possono citare defensina (plant defensin 1.2, PDF1.2), tionina 2.1 (thionin 2.1, THI2.1), una proteina simile all'eveina (hevein-like protein, HEL) e chitinasi B (CHTB); tali prodotti sono comunemente usati per monitorare le risposte di difesa dipendenti da JA (Kunkel e Brooks, 2002).

L'etilene è un ormone vegetale volatile derivato dalla metionina e coinvolto in vari processi fisiologici della pianta, quali accrescimento del fusto, fioritura, maturazione dei frutti e, più in generale, nella senescenza (Salisbury e Ross, 1994). Il suo ruolo nella difesa delle piante è stato valutato in piante mutanti nel metabolismo della trasmissione del segnale (Raymond e Farmer, 1998) ma, a tutt'oggi, mancano dati chiari sulla funzione di questo ormone nella resistenza della pianta, poiché in alcune interazioni sembra avere un effetto positivo, mentre in altre, un effetto negativo (Kunkel e Brooks, 2002). Si hanno conoscenze più chiare sul ruolo di etilene ed acido giasmonico nella trasmissione del segnale per l'induzione di un'altra forma di resistenza, la resistenza sistemica indotta (ISR), una forma di resistenza sistemica stimolata, ad esempio, da rizobatteri. Queste osservazioni hanno portato alla realizzazione di un modello semplificato in cui etilene e JA sono disposti nella stessa via di trasmissione del segnale e rappresentano un sistema di segnalazione indipendente da SA, distinto da un'altro sistema dipendente da SA. Queste due vie metaboliche non agiscono autonomamente l'una rispetto all'altra, ma si influenzano

reciprocamente attraverso una complessa rete di interazioni (Hammond-Kosack e Parker, 2003).

6. BIBLIOGRAFIA

Alghisi P., Favaron F., 1995. Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. *Eur. J. Plant. Pathol.* 101: 365-375.

Beauverie J., 1901. Essais d'immunization des végétaux contre de maladies cryptogamiques. *CR. Acad. Sci. Paris* 133:107-10.

Bi J. L., Felton G. W., 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 21:1511-1530.

Bonas U., Lahaye T., 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Micr.* 5:44-50.

Bonfante P., 1995. Dalla cellula alla pianta: basi molecolari delle comunicazioni cellulari eterologhe. In: *Biologia della cellula vegetale*. Ed. ri. Alpi A., Bonfante P., Casadoro G., Coraggio I., Ligrone R.,

Mariani P., Rascio N., Sparsoli E., Vitale A., pp. 364-372. Unione Tipografico Editrice Torinese (UTET), Torino.

Brady J. D., Fry S. C., 1997. Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H₂O₂. *Plant Physiol.* 115:87-92.

Chappell J., Levine A., Tenhaken R., Lusso M., Lamb C., 1997. Characterization of a diffusible signal capable of inducing defense gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 133:621-629.

Chester K. S., 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q. Rev. Biol.* 8:275-284.

Cohen Y., Gisi U., Mosinger E., 1991. Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38:255-263.

Collmer A., Badel J. L., Charkowski A., O., Deng W.-L., Fouts D. E., Ramos A. R., Rehm A. H., Anderson D. M., Schneewind O., van Dijk K., Alfano J. R., 2000. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 97:8770-8777.

Cornelis G. R., Van Gijsegem, 2000. Assembly and function of type III secretary systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:735-774.

Cruickshank, I. A. M., Mandryk, M., 1960. The effect of stem infestations of tobacco with *Peronospora tabacina* adam. on foliage reaction to blue mold. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 26:369-72.

Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1968. The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sci.* 7:449-458.

Cruickshank I. A. M., 1963. Phytoalexins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1:351-74.

Culver J. N., Dawson W. O., 1991. Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:458-463.

Dangl J. L., Jones J. D. G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.

Davis K. R., Darvill A. G., Albersheim P., Dell A., 1986. Host-pathogen interactions. XXX. Characterization of elicitors of

phytoalexin accumulation released from soybean cell walls by endopolygalacturonic acid lyase. *Z. Naturforschgun.* 41c: 39-48.

Davis K. R., Lyon G. D., Darvill A. G., Albershein P., 1984. Host-pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* 74: 52-60.

De Gara L., de Pinto M. C., Tommasi F., 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant. Physiol. Biochem.* 41: 863-870.

Dixon R. A., Harrison M. J., 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 479-501.

Durner J., Shah J., Klessing D. F., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.

Farr S. B., Kogoma T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Rev.* 55: 561-585.

Flor H. H., 1946. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J. Agric. Res.* 73: 335-357.

Gianinazzi S., Martin C., Vallée J. C., 1970. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez la *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. C. R. Acad. Sci. Paris 270: 2382-2386.

Goodman R. N., Novacky A. J., 1994. The hypersensitive reaction of plant to pathogens. A resistance phenomenon. APS Press. St. Paul, MN.

Grayer R. J., Kokubun T., 2000. Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56: 253-263.

Hadwiger L. A, Beckman J. A., 1980. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* 66: 205-211.

Ham K. S., Kauffmann S, Albersheim P., Darvill A. G., 1991. Host-pathogen interactions. XXIX. A soybean pathogenesis-related protein with β -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 545-552.

Hammond-Kosack K.E., Parker J.E., 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 177-193.

Hofius D., Tsitsigiannis I.D.I., Jones T.D.G. and Mundy J., 2007. Inducible cell death in plant immunity. *Seminar in cancer biology*. 17: 166-187.

Hammerschmidt R., 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 285-306.

Hammerschmidt R., Kuć J., 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 61-71.

Hoschino T., Chida M., Yaumara T., Yoshizawa Y., Mizutani J., 1994. Phytoalexin induction in green pepper cell cultures treated with arachidonic acid. *Phytochemistry* 36: 1417-1419.

Hutcheson S. W., 2001. The molecular biology of hypersensitivity to plant pathogenic bacteria. *J. Plant Path.* 83 (3): 151-172.

Hutcheson S. W., 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 59-90.

Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 439-59.

Klement Z., 1982. Hypersensitivity. In: Mount M.S., Lacy G.H. (eds). *Phytopathogenic prokaryotes*, 149-177. Academic Press. New York.

Klement Z., 1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199: 299-300.

Klement Z., Farkas G. L., Lovrekovich L., 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.

Kohl H., Young D. H., Kaus H., 1984. Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. *Plant Sci. Lett.* 33: 221-230.

Kunkel B. N., Brooks D. M., 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current opinion in plant biology* 5: 325-331.

Lam E., Kato N., Lawton M., 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.

Laugé R., De Wit P. J. G. M., 1998. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fung. Gen. Biol.* 24: 285-297.

Lee S-C., West C. A., 1981. Properties of polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 67: 640-645.

Legendre L., Rueter S., Heinsteins P. F., Low P. S., 1993. Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.* 102: 233-240.

Lespinasse Y., 1994. Apple scab resistance and durability. New races and strategies for the future. In: Schmidt H. Kellerhals M., editors. *Progress in temperate Fruit Breeding.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher. 105-106.

Levine A., 1999. Oxidative stress as a regulator of environmental responses in plants. In: *Plant responses to environmental stresses. From phytotormones to genome reorganization.* Ed. re. H. R. Lerner. The Hebrew University of Jerusalem Givat Ram, Jerusalem, Israel. 247-264.

Longland A. C., Slusarenko A. J., Friend J., 1987. Arachidonic and linoleic acids elicit isoflavonoid phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* (French bean). J. Phytopathol. 120: 289-297.

Lusso M., Kuć J., 1999. Plant responses to pathogens. In: Plant responses to environmental stresses. From phytotormones to genome reorganization. Ed. re. H. R. Lerner. The Hebrew University of Jerusalem Givat Ram, Jerusalem, Israel. 683-706.

Mert-Türk F., Bennet M. H., Mansfield J. W., Holub E. B., 2003. Camalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* following abiotic elicitation or inoculation with virulent or avirulent *Hyaloperonospora parasitica*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 137-145.

Müller K.O., 1958. Studies on phytoalexins: I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. Aust. J. Biol. Sci. 11: 275-300.

Müller K.O., Borger H., 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthorainfestans-Resistenz der Kartoffel. Arbeitenb aus der Biolo-gischen Reichsanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. 23: 189-231.

Paxton J. D., 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* 101: 106-209.

Peng M., Kuć J., 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* 82: 696-699.

Ray J., 1901. Les maladies cryptogamiques des végétaux. *Rev. Gen. Bot.* 13: 145-51.

Ren Y. Y., West C. A., 1992. Elicitation of diterpene synthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.* 99: 1169-1178.

Reymond P., Farmer E. E., 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology* 1: 404-411.

Ricci P., Bonnet P., Huet J-C., Sallantin M., Beauvis-Cante F., Brunetau M., Billard V., Michel G., Pernollet J-C., 1989. Structure and activity of proteins from the pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183: 555-563.

Roco A., Castaneda P., Peraz L. M., 1993. Oligosaccharides released by pectinase treatment of *Citrus limon* seedlings are elicitors of the plant response. *Phytochemistry* 33: 1301-1306.

Ryerson D. E. e Heath M. C., 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* 8: 393-402.

Salisbury F. B., Ross C. W., 1994. Fisiologia Vegetale. Seconda Edizione italiana condotta sulla quarta edizione americana. Edizioni Zanichelli. 439-447.

Sharp J. K., McNeil M., Albersheim P., 1984a. The primary structure of one elicitor active and seven elicitor-inactive hexa-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial cell walls of *Phytophthora megarsperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* 259: 11321-11336.

Sharp J. K., Valent B., Albersheim P., 1984b. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259: 11312-11320.

Staskawicz B., Mudgett M., Dangl J., Galan J., 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 274: 2063-2065.

Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J. P., 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathology* 35: 235-70.

Stoessl A., Arditti J., 1984. Orchid phytoalexins. In: Arditti, J. (Ed), *Orchid Biology. Reviews and Perspectives, III.* Cornell University Press, Ithaca, 151-175.

Van Loon L. C., 1983. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 265-73.

Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J., 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 7.1–7.28

Walker-Simmons M., Hadwiger L., Ryan C. A., 1983. Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 194-199.

White R. F., 1979. Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-12.

Zook M. N., Kuć J. A., 1991. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase in elicitor-treated or fungal infected potato tissue. *Physiol. Mol. Plant Pathos.* 39: 377-390.

CAPITOLO II

INDUTTORI DI RESISTENZA

1. INTRODUZIONE

L'acquisizione di resistenza in una pianta può essere indotta da vari fattori: patogeni avirulenti, ceppi incompatibili di patogeni, microrganismi non patogeni, microrganismi patogeni virulenti in particolari condizioni ambientali sfavorevoli alla patogenesi; stress fisici quali alte e basse temperature e, infine, sostanze chimiche (Van Loon *et al.*, 1998). Tutti questi fattori vengono definiti induttori di resistenza (Jakab *et al.*, 2001) o elicitori. Il termine elicitore fu coniato negli anni '70 per le sostanze che inducevano l'accumulo in cellule vegetali di fitoalessine (Keen, 1975) ed è oggi usato per indicare sostanze tutte le molecole in grado di stimolare qualunque tipo di risposta di difesa nelle piante (Ebel, 1986). A tutt'oggi si conoscono diversi tipi di elicitori di origine chimica (elicitori abiotici) o prodotti dalla pianta o dal patogeno (elicitori biotici). Sono caratterizzati dal non avere in genere una comune struttura chimica: gli elicitori possono essere infatti oligosaccaridi, lipidi, peptidi o proteine, oltre a quelli di sintesi. Questa notevole diversità chimica degli elicitori indica che le piante sono di fatto in grado di riconoscere un grande numero di sostanze strutturalmente differenti come segnali di attivazione delle proprie difese.

Gli elicitori sono in grado di fungere da molecole-segnoale a concentrazioni molto basse, dell'ordine delle nanomoli (Shibuya e

Minami, 2001), distinguendosi così dalle tossine; queste ultime agiscono con un differente meccanismo, senza stimolare particolari vie metaboliche nella pianta ed esplicano la loro attività biologica solo a concentrazioni assai più elevate rispetto a quelle degli elicitori (Boller, 1995).

Ci sono molti esempi di resistenza indotta fatta acquisire sia per via biologica che chimica nei confronti di una vasta gamma di patogeni. In entrambi i casi, si verificano risposte fisiologiche riferibili alla resistenza indotta (Jakab *et al.*, 2001; Garcion *et al.*, 2007).

2. Induttori biotici

Sono rappresentati spesso da organismi avirulenti e/o dagli stessi microrganismi patogeni che, una volta a contatto con la pianta, non riescono a causare malattia per l'instaurarsi di una condizione di incompatibilità sfociante nell'espressione di resistenza. In entrambe le situazioni, la pianta non rimane passiva, in quanto, anche senza malattia, una cascata di eventi la porta ad essere più pronta in caso di successivi tentativi di ancoramento da parte dello stesso patogeno o di altri potenziali aggressori.

Anche microrganismi che per natura non sono fitopatogeni possono indurre questo stato di resistenza acquisita. E' il caso dei rizobatteri, batteri rinvenibili a contatto con le radici delle piante. Essi vivono nella rizosfera/rizopiano, in un rapporto di simbiosi con la pianta, nutrendosi degli essudati radicali senza arrecarle alcun danno: anzi, alcuni di essi apportano beneficio all'ospite stimolandone l'accrescimento. Per questo motivo vengono definiti rizobatteri promotori della crescita della pianta

(“plant growth-promoting rhizobacteria”, PGPR). L’aumento nella produttività della pianta è dovuta in larga parte all’inibizione dei microrganismi dannosi da parte dei PGPR; è il caso di molte pseudomonadi fluorescenti, tra i rizobatteri più attivi nel prevenire e/o limitare lo sviluppo di malattie causate da patogeni tellurici (Weller, 1988). Tra le strategie messe in atto, la competizione per il ferro assume grande importanza in quanto i rizobatteri producono assai efficaci siderofori - agenti chelanti a basso peso molecolare specifici per Fe^{3+} - in grado di sequestrare lo ione sottraendolo a molti organismi inclusi certi fitopatogeni; anche la produzione di sostanze antibiotiche e di enzimi idrolitici, come chitinasi e glucanasi, in grado di lisare le cellule degli altri microrganismi, svolgono un ruolo importante nell’antagonismo. Alcuni ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas*, condividono operoni che portano alla sintesi di enzimi responsabili della produzione di polichetidi (Bangera M. G. *et al.*, 1999; Landa B. B. *et al.*, 2002; Mavrodi D. V., 2001; Brodhagen M. *et al.*, 2005) come acido fenazina-1-carbossilico (PCA), 2,4-diacetilfloroglucinolo (2,4 DAPG), pyrrolnitrine, pyoluteorine, lipopeptidi ed HCN (Fig. 1)(Haas D., Keel C., 2003; Raaijmakers *et al.*, 1997). L’evidenza sperimentale indica che tali molecole possano agire inibendo in modo diretto alcuni microrganismi patogeni presenti nel terreno come *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (agente del take-all in frumento)(Mavrodi O. V. *et al.*, 2000), *Thielaviopsis basicola* (agente del marciume nero radicale in tabacco) (Haas D. e Keel C., 2003), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (agente eziologico dell’avvizzimento del riso, ecc...

Un altro aspetto dei polichetidi riguarda la loro capacità di indurre resistenza nelle piante verosimilmente mediante l’attivazione di barriere di difesa postinfettionale. (resistenza sistemica indotta, vedi oltre) (Haas D., Keel C., 2003).

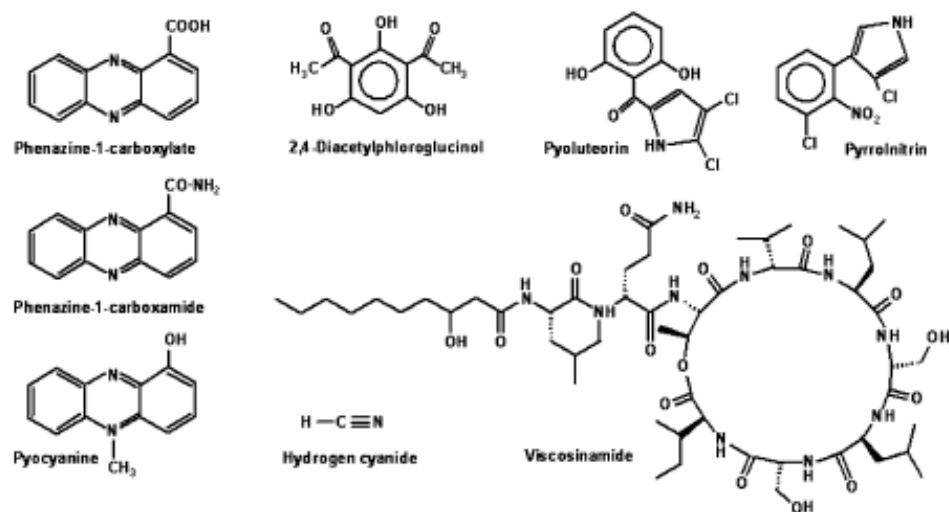


Figura 1: antibiotici prodotti da pseudomonadi fluorescenti capaci di inibire microrganismi patogeni del terreno e di indurre resistenza nelle piante.

La minore suscettibilità della pianta e la minore incidenza della malattia rilevate anche in assenza di interazione diretta tra rizobatteri e agenti fitopatogeni nel terreno, ha permesso di formulare ipotesi di induzione di resistenza nella pianta da parte dei rizobatteri stessi. L'ipotesi è stata suffragata da dati sperimentali (Iavicoli *et al.*, 2003). Questa forma di resistenza, assimilabile alla resistenza sistemica acquisita, è stata definita resistenza sistemica indotta (**Induced Systemic Resistance, ISR**) per distinguerla dalla SAR. Molte caratteristiche della ISR sono, tuttavia, ricollegabili a quelle della SAR: tra queste, la necessità di un intervallo di tempo (tempo di induzione) tra l'attivazione della risposta immunitaria ed il momento in cui si esprimono le connesse barriere resistenza, la aspecificità della protezione e la necessità che l'induttore della resistenza non abbia nessun effetto diretto sul patogeno. Una differenza tra le due forme di

resistenza sta meccanismo nelle diverse vie di segnalazione che permettono l'instaurarsi della resistenza sistemica, a partire dall'organo induttore da cui si è diffuso il segnale: nella SAR l'acido salicilico (SA) ha un ruolo centrale, mentre nella ISR, i principali componenti della rete di segnalazione sono etilene ed acido giasmonico (JA). Mentre la SAR è contraddistinta da sintesi e accumulo di PRs, nella ISR l'interpretazione corrente ammette l'assenza della sintesi di PRs e l'esistenza di altri meccanismi di difesa (Van Loon *et al.*, 1998). Recente evidenza sperimentale indica che tra SAR ed ISR ci sia condivisione di vie di segnalazione o comunque interconnessione. Di fatto, nel 2005 (Hamiduzzaman *et al.*, 2005) su vite, è stata messa in luce la correlazione fra sintesi di PR-4 (endo-chitinasi) e sintesi di acido giasmonico e, di conseguenza, fra la produzione proteina della PR-4 e l'ISR.

Tra gli induttori biotici, si possono annoverare le proteine arpine, espressione dei geni *hrp* di alcune specie batteriche (*E. amylovora*, *P. syringae*, ecc.) coinvolte nelle risposte iper- e normosensitiva, rispettivamente nelle interazioni incompatibili e compatibili, i lipopolisaccaridi (LPS), molecole anfipatiche della membrana esterna dei batteri Gram-negativi e gli oligosaccaridi batterici (OLS) di membrana e periplasmatici e fungini (Ryan, 1987; Dixon *et al.*, 1994).

2.1. Oligosaccaridi batterici (OLS)

Gli OLS derivanti da funghi, dalla parete cellulare vegetale e da batteri rappresentano una classe di elicitori piuttosto ben caratterizzati e tra i primi ad essere stati identificati come tali (Darvill e Albersheim,

1984; Stefani *et al.*, 1994). Sono molte le teorie formulate sui ruoli biologici di queste molecole, non solo siano per la loro natura di molecole segnale al momento dell'ancoramento, ma anche il loro ruolo essenziale nel condizionare sviluppo, crescita e sopravvivenza in diversi organismi (Darvill *et al.*, 1992). Gli OLS possono agire, da sole o in combinazione sinergica con frammenti di parete della cellula vegetale (es.: oligogalatturonidi), come attivi elicitori di risposte di difesa condizionanti la successiva inoculazione provocatrice (Cervone *et al.*, 1996; Shibuya e Minami, 2001).

Differenti sono gli omo- ed etero-OLS associati alle cellule dei batteri: tra questi, quelli periplasmatici, anionici – i cosiddetti MDO (Membrane-Derived Oligosaccharides) – di *Escherichia coli* (*E. coli*), altamente ramificati, costituiti da una struttura centrale e da residui laterali di unità di glucosio; i β -glucani periplasmatici ciclici prevalentemente neutri di *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*; quelli di *Erwinia amylovora*, a struttura ramificata e di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, periplasmatici non ciclici, neutri, altamente ramificati; quelli *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* neutri, a catene lineari di glucosio e mannosio.

È noto che il potenziale idrico dell'ambiente esterno sia uno dei parametri fisici condizionanti la vita dei microrganismi in un dato habitat: la capacità di adattamento allo stress osmotico è fondamentale per la loro sopravvivenza. L'evidenza sperimentale (Csonka, 1989; Geiger *et al.*, 1992; Talaga *et al.*, 1994) suggerisce che:

- a) OLS periplasmatici vengano sintetizzati dai batteri Gram-negativi solo in ambienti a bassa forza ionica
- b) Contribuiscano in modo sostanziale all'equilibrio di Donnan

c) Siano necessari per la normale regolazione porinica

Alcune di queste molecole osmoregolatrici sono state estratte con TCA dal ceppo IPV-BO 185L di *P. syringae* pv. *aptata* e purificate mediante cromatografia su colonna; esse hanno agito, a concentrazioni nanomolari, da segnali primari mobili inducendo in tabacco resistenza al patogeno omologo compatibile *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Stefani *et al.*, 1994). Queste stesse molecole non hanno alterato, però, la reazione ipersensibile (HR) in tabacco indotta dal batterio eterologo *P. syringae* pv. *aptata*.

2.2. Lipopolisaccaridi batterici (LPS)

La parete batterica è la prima linea di difesa contro le molecole antimicrobiche e gli stress ambientali; considerato che molte molecole sulle superfici dei batteri sono determinanti antigenici nelle interazioni ospite-patogeno sia negli animali che nelle piante, è importante, per meglio comprendere i meccanismi di queste interazioni, caratterizzare sia l'architettura molecolare della superficie della cellula batterica che capire come i batteri riescano a modificare questa architettura in risposta a differenti tipi di ambienti che possono essere assai eterogenei e complessi (si pensi, ad esempio, ai differenti tipi di terreno o temperatura o di disponibilità d'acqua). Gli LPS sono molecole che vanno incontro a cambiamenti strutturali durante l'instaurarsi di rapporti di simbiosi e nei casi di patogenicità. Sono componenti intrinseci caratteristici e associati esclusivamente con la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, ne rappresentano la maggior componente strutturale e, in particolare, sono la parte più esposta, detta

antigene-O o catena O-specifica, è responsabile delle variazioni strutturali con proprietà immunogeniche. Furono scoperti alla fine del '900 dal tedesco Pfeiffer e dall'italiano Centenni, rispettivamente in *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi*; il nome lipopolisaccaridi o LPS fu loro attribuito nel '43 da Shear per evidenziarne la composizione chimica: lipidi, carboidrati e fosforo.

Gli LPS sono glicoconiugati costituenti il lato esterno della membrana esterna, assieme a fosforo e proteine; rappresentano il 10-15% delle molecole totali della membrana esterna e si stima che ne costituiscano il 75% della sua superficie (circa 10^5 molecole per μm^2); sono molecole anfipatiche con una massa di circa 10 kDa, assai variabili in composizione chimica sia infra- che intraspecifica.

3. Induttori abiotici di tipo chimico

Un composto chimico può essere definito attivatore di SAR, quando ha i seguenti requisiti: non deve possedere attività antimicrobica diretta, deve indurre resistenza ai patogeni del modello biologico e indurre l'espressione degli stessi marcatori molecolari. In definitiva, un induttore abiotico sintetico modifica l'interazione pianta-patogeno in maniera che essa sia simile fenotipicamente all'interazione incompatibile.

Un importante induttore abiotico naturale è rappresentato dall'acido salicilico SA, considerato uno dei principali segnali molecolari di SAR. Applicazioni esogene sono in grado di indurre le stesse risposte di resistenza determinate da una induzione mediata da microrganismi. (Kessman *et al.*, 1994; Sticher *et al.*, 1997).

3.1. Principali induttori chimici

3.1.1. Fosetil-Al

Il Fosetil-Al (Aliette) è un altro composto di sintesi avente capacità di indurre resistenza nelle piante. Mostra un'attività antifungina molto debole e nelle piante trattate si ha un più rapido accumulo di fitoalessine (Kessmann *et al.*, 1994).

3.1.2. Acidi nicotinici e benzotiadiazoli (BTH)

Usando il modello della SAR nel cetriolo, ben caratterizzata biologicamente, sono state identificate due classi di composti chimici in grado di mimare, SA per l'attivazione della SAR contro patogeni necrogenici: l'acido 2,6-dicloro isonicotinico (INA) e i suoi derivati e i benzo(1,2,3) tiadiazoli, tra i quali è da ricordare il S-metil benzo(1,2,3)tiadiazolo-7-carbotiato, acibenzolar-S-metil (ASM), presente sul mercato con il nome di Actigard negli USA e BION in Europa (*Fig. 2*). Nessun derivato di INA è stato commercializzato, vista la bassa tolleranza delle colture, ma viene largamente usato nella ricerca per studiare il meccanismo d'azione della SAR.

Entrambi i composti non hanno nessuna attività antimicrobica diretta *in vitro* e attivano risposte di resistenza nelle piante contro diverse specie di microrganismi patogeni.

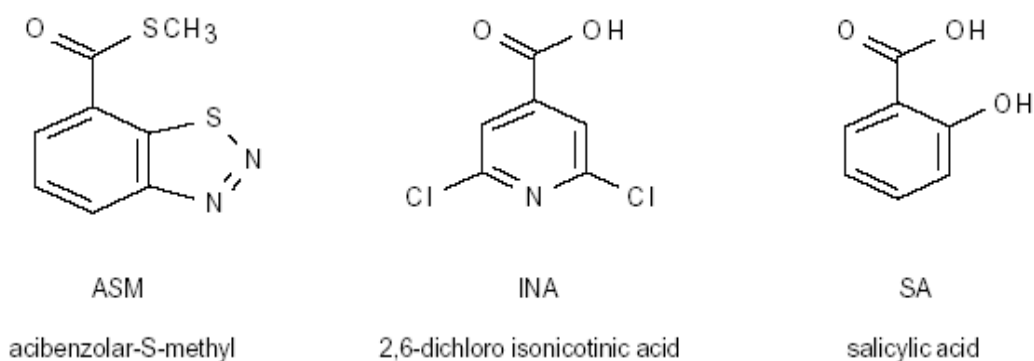


Figura 2. Attivatori della SAR: acibenzolar-S-methyl (ASM), acido 2,6-dicloro isonicotinico (INA) e acido salicilico (SA), naturale molecola segnale della SAR (Oostendorp et al., 2001).

Anche a livello molecolare, stimolano per massima parte gli stessi geni di resistenza indotti da microrganismi viventi e da SA. Per capire quale fosse il ruolo di ASM e INA nella risposta immunitaria della pianta, sono state usate piante transgeniche di tabacco capaci di degradare l'acido salicilico, considerato ormai segnale secondario per l'induzione della resistenza sistemica e mutanti di *Arabidopsis* selezionati per la loro insensibilità all'azione di ASM. Nelle piante di tabacco, ASM è ancora in grado di indurre le risposte di resistenza, mentre nelle piante mutate di *Arabidopsis*, sia SA sia INA non sono più in grado di indurre resistenza. Questi studi suffragano l'ipotesi che entrambe le sostanze siano coinvolte nella rete di segnalazione intracellulare culminante nell'espressione della SAR, inserite nel passaggio in cui interviene SA o subito a valle (*Fig. 3*). Anche in piante di frumento sono stati ottenuti risultati simili, in quanto sia SA, INA e ASM, attivano la stessa serie di geni di resistenza.

piante, è risultato essere un potente induttore di resistenza. Già 40 anni or sono, è stata riportata la sua azione protettiva su piante di pisello nei confronti del fungo oomicete *Aphanomyces euteiches* (Papavizas e Davey, 1963; Papavizas, 1964).

Il BABA agisce aspecificamente contro molti organismi patogeni (virus, batteri, funghi, nematodi); non presenta attività antimicrobica diretta e ciò supporta l'ipotesi che la sua funzione si espleti nell'indurre risposte di difesa nella pianta (Jakab *et al.*, 2001).

Le modalità di azione di questa sostanza non sono state ancora chiarite. E' stato rilevato che in pomodoro si ha induzione della proteina PR-1 quando viene applicato ad alte concentrazioni (Oostendorp *et al.*, 2001).

3.1.4. Prohexadione-Calcio (ProCa)

Questo composto, il cui nome chimico è calcium 3,5-diosso-4-propionil-cicloesano-carbossilato, è il principio attivo del bioregolatore noto con i nomi commerciali REGALIS (10% ProCa) e APOGEE (27,5% ProCa) (Fig. 4).

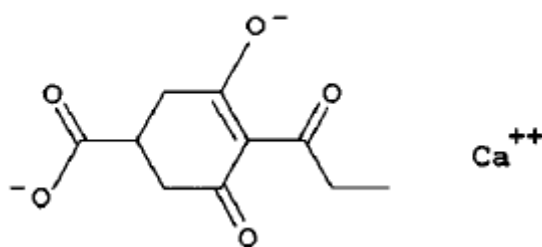


Figura 4. Struttura del prohexadione-Ca (Calcium 3,5-diosso-4-propionil-cyclohexane-carboxylate).

Esso è stato messo a punto come prodotto ritardante la crescita dei germogli di melo e pero, in modo da poter gestire meglio i frutteti (Evans *et al.*, 1997; Greene, 1999; Owens e Stover, 1999; Unrath, 1999; Basak e Rademacher, 2000; Elfving *et al.*, 2002; Rademacher e Bucci, 2002). L'uso comporta vari benefici: le piante crescono con minor vigore, i germogli sono più corti del 30-60% in modo che tutta la chioma è più ridotta, più compatta e di conseguenza anche i filari di alberi hanno un volume ridotto.

Anche la fruttificazione è avvantaggiata, in quanto una maggior quantità di assimilati non utilizzati per l'accrescimento vegetativo, può destinata alla produzione e maturazione dei frutti. La maggiore disponibilità di assimilati porta anche ad un minor aborto dei frutti giovani e di conseguenza ad un aumento del loro numero. La pianta è in grado di nutrire più frutti e per più tempo (Byers e Yoder, 1999).

Oltre a questi effetti di tipo agronomico, è stato riscontrato che ProCa ha influenza sulla risposta della pianta alle malattie. La evidenza sperimentale indica che le piante trattate sono meno colpite da colpo di fuoco batterico (*E. amylovora*), ticchiolatura (*Venturia inaequalis*) (Bini *et al.*, 2008), oidio (*Podosphaera leucotricha*, *Sphaerotheca pannosa*), peronospora della vite (*Plasmopara viticola*), ecc. (Bazzi *et al.*, 2003). Recenti lavori hanno evidenziato che l'applicazione di ProCa riduce anche l'incidenza di infestazioni da insetti (Krawczyk e Greene, 2002).

Il ProCa non ha effetti antimicrobici diretti e si suppone costituisca un segnale per l'induzione di SAR. Esso funziona come analogo dell'acido 2-ossoglutarico e dell'acido ascorbico. Gli enzimi del tipo diossigenasi che hanno questi composti come co-substrati, vengono così inibiti da ProCa quando li utilizza al loro posto.

La vistosa riduzione dell'accrescimento longitudinale dei germogli è raggiunta attraverso l'inibizione di distinte diossigenasi coinvolte nella biosintesi delle gibberelline, ormoni vegetali responsabili dell'allungamento del fusto della pianta (Rademacher, 2000). Con una minor quantità di gibberelline circolanti, i germogli crescono meno.

L'aspetto più interessante della funzione di questo inibitore diossigenasico è la sua influenza nel metabolismo dei flavonoidi: infatti, le diossigenasi dipendenti dall'acido 2-ossiglutarico svolgono un ruolo anche nel metabolismo di questi composti. Di conseguenza, l'inibizione delle diossigenasi da parte di ProCa porta a cambiamenti significativi nella sintesi dei flavonoidi e dei loro precursori fenolici. Tutti questi cambiamenti metabolici sono ovviamente correlati alla maggior resistenza della pianta alle malattie, dato che i composti fenolici sono implicati nella capacità della pianta di resistere agli attacchi dei patogeni. L'inibizione da parte di ProCa delle diossigenasi comporta la formazione in melo e anche in pero di nuovi composti come i 3-ossiflavonoidi, assenti in condizioni di normalità. Il ProCa agisce come un analogo dell'acido 2-ossiglutarico e per questo inibisce tutti gli enzimi diossigenasici che lo utilizzano (Rademacher *et al.*, 1992); in particolare, l'inibizione dell'enzima flavanone 3-idrossilasi (FHT), catalizzante l'idrossilazione di flavanoni in diidroflavonoli, interferisce con la sintesi dei composti flavonoli che si formano normalmente, quali catechine, proantocianidine ed antociani. La presenza dei 3-deossiflavonoidi nelle foglie di melo trattate con il ProCa, indica che viene indotta una via alternativa, con formazione dei flavan 4-oli ed i composti derivati, che nell'insieme potrebbero essere coinvolti nell'aumentata resistenza alle malattie.

4. BIBLIOGRAFIA

Albersheim P., Darvill A. G., Mcneal M., Valent B. S., Sharp J. K., Nothnagel E. A., Vavis K. R., Yamazaki N., Gollin D. J., York D. J., York W. S., Dudman W. F., Darvill E. D., Dell A., 1983. Oligosaccharins, naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions. In: Ciferri, O. and L. Dure III (eds): Structure and Function of Plant Genomes: 293-312.

Bangera M. G., Tomashow L. S., 1999. Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J. Bacteriol. 181: 3155-3163.

Basak A., Rademacher W., 2000. Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of prohexadione-Ca. Acta Horticulturae 514:41-50.

Bazzi C., Messina C., Tortoreto L., Bini F., Cecca G, S., Stefani E., 2003. Investigation on the possibile use of abiotic and biotic elicitors in defence-related responses in plants. Eur. J. Hort. Sci. 68(3) S. 115-122.

Bini F., Ragaini A., Bazzi C., 2008. Resistance responses induced by the plant growth retardant prohexadione-Ca in apple against scab infections. *Annals of Applied Biology*, 152: 19-27.

Brodhagen M., Paulsen I., Loper J. E., 2005. Reciprocal Regulation of Pyoluteorin Production with Membrane Transporter Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microb.* 71: 6900-6909.

Byers R. E., Yoder K. S., 1999. Prohexadione-calcium inhibits apple, but not peach, tree growth, but has little influence on apple fruit thinning or quality. *HortScience* 34:1205-1209.

Boller T., 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 189-214

Cervone F., De Lorenzo G., Aracri B., Bellincampi D., Caprari C., Devoto A., Leckie F., Mattei B., Nuss L. e Salvi G., 1996. La poligalatturonasi, le PGIP e gli oligogalatturonidi nelle interazioni fra piante e funghi fitopatogeni. IX incontro Aspetti Molecolari e Fisiologici delle interazioni pianta-patogeno. Ragusa, 31 maggio-1 giugno 1996 (Abstract)

Csonka L. N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53: 121-147

Darvill A. G., 1992. Oligosaccharins—oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. *Glycobiology* 2: 181-198

Dixon R. A., Harrison M. J., 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.

Ebel J., 1986. Phytoalexins synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annu. Rev. Phytopat.* 24: 235-264

Elfving D. C., Sugar D., Faubion D., 2002. Pear tree shoot growth patterns in relation to chemical control of vegetative growth with prohexadione-calcium (APOGEE®). *Acta Horticulturae* 596:711-716.

Evans R. R., Evans J. R., Rademacher W., 1997. Prohexadione calcium for suppression of vegetative growth in eastern apples. *Acta Horticulturae* 451:663-666.

Garcion C., Lamotte O., Metraux J. P., 2007. Mechanisms of defence to pathogens: Biochemistry and physiology. In: *Induced resistance for plant defence*. Eds.: Walters D., Newton A., Lyon G., Blackwell Publishing. 258 pp.

Geiger O., Russo F. D., Sihavy T. S. and Kennedy E. P., 1992. Membrane-derived oligosaccharides affect porin osmoregulation only in media of low ionic strength. J. Bacteriol. 174: 1410-1413

Hamiduzzaman M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J-M., Mauch-Mani B., 2005. β -Aminobutyric acid-Induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. MPMI, 18: 819-829.

Hammerschmidt R., Métraux J.-P., Van Loon L.C., 2001. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May. Eur. J. Plant Path. 107: 1-6.

Haas D., Keel C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 117–53.

Iavicoli A., Boutet E., Buchala A., Metraux J.-P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. MPMI 16: 851-858.

Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J. P., Mauch-Mani B., 2001. β -Aminobutyric acid-induced resistance in plant. Eur. J. Plant Path. 107: 29-37.

Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439-59.

Kessmann H., Staub T., Oostendorp M., Goerlach J., Friedrich L., Lawton K., Ryals J., 1996. CGA 2455704: mode of action of a new plant activator. Proceedings of an International Conference at The Brighton Centre and The Brighton Metropole Hotel, Brighton, UK, 18-21 November 1996.

Keen N. T., 1975. Specific elicitors of plant phytoalexins production: determinants of race specificity in pathogens? *Science* 187: 74-75

Krawczyk G., Greene G. M., 2002. The impact of plant growth regulator Apogee on insect pest populations and fruit quality. *Pennsylv. Fruit News.* 82:18-24.

Landa B. B., Mavrodi O. V., Raaijmakers J. M., McSpadden Gardener B. B., Thomashow L. S., Weller D. M., 2002. Differential Ability of Genotypes of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* Strains To Colonize the Roots of Pea Plants. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3226-3237.

Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G., Thomashow L. S., 2001. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 183: 6454-6465.

Mavrodi O. V., McSpadden Gardener B. B., Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Weller D. M., Thomashow L. S., 2000. Genetic Diversity of *phlD* from 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopath. 91: 35-43.

Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T., 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. Eur. J. Plant Path. 107: 19-28.

Owens C. L., Stover E., 1999. Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione-calcium. HortScience 34:1194-1196.

Papavizas G. C., 1964. Greenhouse control of *Aphanomyces* root rot of peas with aminobutyric acid and methylaspartic acid. Plant Dis. Rep. 48:537-541.

Papavizas G. C., Davey C. B., 1963. Effect of amino compounds and related substances lacking sulfur on *Aphanomyces* root rot of peas. Phytopathology 53:116-122.

Rademacher W., 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. plant physiol. and Plant Mo. Biol.* 51:501-531.

Rademacher W., Bucci T., 2002. New plant growth regulators: High risk investment? *Hort Technology* 12:64-67.

Raaijmakers J. M., Weller D. M., Thomashow L. S., 1997. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments. *Appl. Environ. Microb.* 63: 881-887.

Ryan C. A., 1987. Oligosaccharide signalling in plants. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3: 295-317.

Shibuya N. and Minami E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59: 223-233

Stefani E., Bazzi C., Mazzucchi U., 1994. Modification of the *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*-tobacco leaf interaction by bacterial oligosaccharides. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 397-406.

Sticher L., Mauch-Mani, B., Métraux J. P., 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-70.

Talaga P., Fournet B. and Bohin J. P., 1994. Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. J. Bacteriol. 176: 6538-6544

Unrath C. R., 1999. Prohexadione-Ca: A promising chemical for controlling vegetative growth of apples. HortScience 34:1197-1200.

Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-83.

Weller D. M., 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 379-407.

FINALITÀ DELLA TESI

Le ricerche svolte presso il laboratorio di Fitobatteriologia del Di.S.T.A. (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali) hanno avuto per oggetto principale di studio la capacità di elicitori biotici ed abiotici di indurre resistenza nel pomodoro all'avvizzimento batterico causato da *Ralstonia solanacearum*, nel pero al colpo di fuoco causato da *Erwinia amylovora* e nella rognia della vite causata da *Agrobacterium vitis*.

La tesi si compone di sei capitoli:

CAPITOLO I e II

Questi capitoli hanno scopo introduttivo e trattano molti aspetti coinvolti nella resistenza indotta in tutte le sue manifestazioni. Ho cercato di offrire un quadro generale sul ruolo degli elicitori nella patogenesi e nei rapporti fra piante e microrganismi oltre a descrivere gli induttori chimici e biologici più noti e studiati.

CAPITOLO III

Descrive esperimenti di laboratorio aventi lo scopo di saggiare l'attività antimicrobica *in vitro* del ceppo batterico antagonista IPV-BO G19 di *Pseudomonas fluorescens* nei confronti di *R. solanacearum* (già noto per la sua efficacia nei confronti di *E. amylovora*) e di identificarne il meccanismo d'azione. Esperimenti in cella climatica

avevano lo scopo di verificare l'efficacia di IPV-BO G19 *in planta* nei confronti di *R. solanacearum*.

CAPITOLO IV

Tratta di esperimenti condotti in laboratorio per caratterizzare la risposta immunitaria delle piante di pomodoro trattate con il ceppo antagonista IPV-BO G19 come induttore.

CAPITOLO V

Descrive esperimenti di lotta biologica in pieno campo contro *E. amylovora* su astoni di pero applicando IPV-BO G19 (in diverse formulazioni) a confronto con biofungicidi ed elicitori abiotici già in commercio. Nello stesso patosistema saggi enzimatici preliminari sull'incremento di sintesi di catalasi, perossidasi e superossidodismutasi hanno avuto lo scopo di verificare eventuale induzione di resistenza causata da IPV-BO G19 applicato sulle foglie.

CAPITOLO VI

Sono trattati esperimenti preliminari di lotta biologica in serra ed in campo su barbatelle innestate di vite nei confronti di *A. vitis* usando IPV-BO G19 a confronto con biofungicidi ed elicitori abiotici già noti.

CAPITOLO III

EFFICACIA DEL CEPPO IPV-BO G19 NEI CONFRONTI DI *Ralstonia solanacearum*

1. INTRODUZIONE

A tutt'oggi non è stato ancora sviluppato un metodo efficace per la lotta a *R. solanacearum*. La selezione di linee varietali resistenti, la rotazione colturale e l'uso di battericidi hanno incontrato un successo limitato (Ciampi-Panno *et al.*, 1989). La resistenza ottenuta con incroci intervarietali a questa malattia è un aspetto molto importante della lotta integrata, ma tale tipo di resistenza si è mostrata poco efficace e soprattutto poco stabile e durevole. (Hayward, 1991; Boucher *et al.*, 1992). Infatti, la grande variabilità che caratterizza i ceppi di *R. solanacearum* (Elphinstone, 1992) in combinazione con l'influenza di determinati fattori ambientali sulle interazioni ospite-patogeno (Hayward, 1991) spesso limita l'espressione di resistenza a specifiche regioni geografiche. Studi non troppo recenti hanno indicato la lotta biologica con uso di batteri antagonisti terricoli come possibile rimedio nei confronti di questo patogeno (McLaughlin *et al.*, 1990; Ciampi-Panno *et al.*, 1989). Toyota e Kimura nel 2000 hanno evidenziato l'effetto soppressivo di alcuni batteri antagonisti. Potenziali antagonisti sono rappresentati da ceppi avirulenti mutanti di *R. solanacearum* (Dong *et al.*, 1999) ed alcuni rizobatteri antagonisti naturali come *Bacillus* spp. (Silveira *et al.*, 1995; Lemessa F. e Zeller W., 2007), *Pseudomonas* spp. (Guo *et al.*, 2001; Lemessa F. e Zeller W., 2007) e

Streptomyces spp. (El Albyad *et al.*, 1996; Lemessa F. e Zeller W., 2007).

1. MATERIALI E METODI

1.1 Saggi *in vitro*

Il ceppo batterico IPV-BO G19 di *Pseudomonas fluorescens* è stato saggiato *in vitro* per valutarne l'attività antagonista nei confronti di *R. solanacearum*. A tale scopo, sono state usate due differenti metodologie:

1. Secondo un protocollo del ns. laboratorio (Bazzi, com. pers.), un'ansata del ceppo antagonista è stata deposta al centro di una piastra di KB-agar su un'areola avente diametro di circa 1 cm; dopo 48 ore di incubazione a 27 °C, l'antagonista cresciuto è stato accuratamente asportato dalla superficie del substrato con spatola sterile e, per uccidere le cellule dell'antagonista, le piastre sono state esposte a vapori di cloroformio per circa 40 minuti; in seguito 2 ml di sospensione di *R. solanacearum*, (ca 10⁸ cfu/ml), sono stati omogeneamente distribuiti sulla medesima piastra.
2. In un altro protocollo il ceppo antagonista è stato trasferito su una piastra di GA-medium su un'areola al centro; dopo 48 h di incubazione a 27 °C, i batteri sono stati eliminati come

descritto in precedenza e sono stati versati sulla piastra in questione 5 ml di agar semisolido (GA-medium al 7% di agar batteriologico) insemiati con 50 µl di sospensione di *R. solanacearum* (ceppi: PD 2762 ed IPV-BO 5836) alla concentrazione di circa 10^8 cfu/ml, facendo in modo che l'agar semisolido si distribuisse su tutta la piastra (Vanneste *et al.* 1992).

In entrambi i metodi, le piastre, insemiati con *R. solanacearum*, sono state poste in termostato ad incubare a 27 °C. Dopo 24 ore è stata rilevata l'eventuale presenza di un alone di inibizione attorno all'area dove era cresciuta la macrocolonia del batterio antagonista, indicante la capacità di quest'ultimo di inibire la crescita del patogeno.

1.2. Meccanismo d'azione

Si è cercato di valutare come le sostanze ad attività antimicrobica prodotte dal ceppo IPV-BO G19 reagiscano quando sottoposte a trattamenti chimici modificanti l'ambiente dove sono prodotte (trattamenti con enzimi proteolitici e soluzioni di ioni Fe^{3+}), al fine di compararle a quelle già studiate prodotte dai ceppi IPV-BO 4027C e G31, positivi rispettivamente per ioni Fe^{+++} ed enzimi proteolitici.

Giovani colonie del batterio antagonista IPV-BO G19 sono state fatte crescere al centro di una piastra di GA-medium alla temperatura di 27 °C per 48 ore, quindi sono state rimosse raschiando delicatamente la

superficie del substrato con una spatola sterile e le piastre sono state successivamente esposte a vapori di cloroformio per circa 40 minuti.

Attorno all'area di crescita batterica, sono stati fatti fori del diametro circa 2-3 mm ad una distanza dal centro, dipendente dal diametro dell'alone d'inibizione atteso. All'interno dei fori è stata messa una delle seguenti soluzioni:

- | | |
|----------------------------|---|
| a) Pronasi | 10 µl da stock 20 mg/ml |
| b) Proteinasi K | 10 µl da stock 10 mg/ml |
| c) FeCl₃ | 10 µl da stock 50 mM di FeCl₃ in 10 mM di HCl |
| d) acqua sterile | 10 µl (controllo negativo) |

Dopo circa 30 minuti (tempo necessario per la diffusione delle soluzioni), sulla piastra sono stati versati 5 ml di semisolido, a cui sono stati precedentemente aggiunti 50 µl di sospensione di *R. solanacearum* (circa 10⁸ cfu/ml). Le piastre sono state poste in termostato alla temperatura di 27 °C per ulteriori 24 ore. L'assenza di alone d'inibizione in corrispondenza di uno o più fori è stato considerato indice di disattivazione delle sostanze antibiotiche da parte della soluzione versata nel foro (Galasso *et al.*, 2002).

I controlli usati sono stati: IPV-BO G31 (*Bacillus subtilis*) ed IPV-BO 4027C (*Pseudomonas* spp.) come positivi rispettivamente per enzimi proteolitici e ioni Fe⁺⁺⁺ ed IPV-BO 5836 (*R. solanacearum*) come controllo negativo.

1.3. Verifica di produzione di 2,4-DAPG e PCA

Per verificare l'eventuale capacità del ceppo batterico di produrre 2,4-DAPG e/o PCA sono stati fatti saggi PCR (Raaijmakers *et al.*, 1997).

1.3.1. Estrazione del DNA

Il ceppo batterico IPV-BO G19 è stato allevato in 5 ml di LB-broth e messo in agitatore rotativo a 100 rpm per una notte a 27°C, in modo da ottenere una coltura ad alta densità. Successivamente 1,5 ml di coltura sono stati centrifugati a 14000 rpm per 2 minuti; il pellet è stato poi risospeso in 570 µl di TE buffer, sono stati aggiunti 30 µl di SDS 10% (per lisare le pareti cellulari) e 3 µl di proteinasi K (20 mg/ml) (per digerire le proteine totali e permetterne la loro estrazione ed eliminazione) ed il tutto è stato mescolato per inversione 10 volte ed incubato a 37°C per 1 ora. Sono stati in seguito aggiunti 100 µl di NaCl 5M e agitati in vortex per 5 – 10 secondi. Sono stati aggiunti 80 µl di CTAB/NaCl, agitati in vortex per 5 – 10 secondi ed incubati a 65°C per 10 minuti. Sono stati aggiunti 600 µl di cloroformio/alcool isoamilico (50:50), vortexati per 5 – 10 secondi e centrifugati per 5 minuti in microcentrifuga a 14000 rpm; il surnatante acquoso è stato trasferito in un nuovo tubo da centrifuga (400-500 µl) ed è stato aggiunto un volume uguale di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1); il tutto è stato agitato in vortex per 5 – 10 secondi e centrifugato al massimo numero di giri (14000 rpm) per 5 minuti. Il surnatante in fase acquosa (ca 400-500 µl) è stato trasferito in un nuovo tubo da

centrifuga ed vi è stato aggiunto un egual volume di cloroformio/alcool isoamilico (50:50), il tutto è stato centrifugato per 5 minuti a 14000 rpm. Questa fase di lavaggio è stata ripetuta tre volte per eliminare i residui di fenolo-cloroformio. Il surnatante è stato trasferito (400-500 µl) in un nuovo tubo da centrifuga, sono stati aggiunti 400-500 µl di isopropanolo (per far precipitare gli acidi nucleici) ed agitati 10 volte per energica inversione; il tutto è stato centrifugato per 10 – 15 minuti al massimo numero di giri (14000 rpm). Il surnatante è stato eliminato ed al pellet conservato, è stato aggiunto in seguito 1 ml di etanolo al 70% ed il tutto centrifugato per 5 minuti al massimo numero di giri (14000 rpm) per ottenere un nuovo pellet (lavaggio). Il surnatante è stato rimosso con cura mentre il pellet, mantenuto allo scuro, è stato essiccato all'aria per 10-15 minuti; lo stesso è stato poi risospeso in 50 µl di acqua distillata sterile e conservato a -20°C.

1.3.2. Saggio PCR

Sono stati selezionati 2 coppie di primers: una per saggiare la capacità del ceppo a produrre il 2,4-DAPG, l'altra per il PCA. I primers Phl2a e Phl2b sono stati disegnati da sequenze all'interno del *locus phlD* che codifica per una proteina di 349 aminoacidi omologa alla chalcone sintasi nelle piante. I primers PCA2a e PCA3b sono stati disegnati all'interno della sequenza tra i *loci phzC* and *phzD*: il primo codifica per una proteina di 400 aminoacidi simile alla DAHP (2 cheto-3-deossiarabinoeptulosonato) sintasi nelle piante, mentre il secondo codifica per una proteina di 207 aminoacidi simile alla isochorismatasi di *Escherichia coli*. L'amplificazione è avvenuta in 25 µl di volume di reazione finale contenenti circa 50 ng di DNA o 5 µl di sospensione

cellulare lisata, Buffer PCR 1X (Promega, 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer, M890A), nucleotidi 200 μ M ciascuno, primers 0,8 μ M ciascuno, 2,0 U di DNA polimerasi (Promega, GoTaq Flexi DNA Polymerase, M830A). Il profilo termico della reazione consisteva in una denaturazione iniziale di 2 minuti a 94°C seguiti da 30 cicli costituiti da 60 secondi a 94°C, 45 secondi a 67°C e 60 secondi a 72°C e da un'estensione finale di 10 minuti a 72°C. Gli amplificati (10 μ l) sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1,3%; in seguito il gel è stato messo a colorare in una soluzione di bromuro di etidio per 30 minuti ed a decolorare in acqua distillata per 3 minuti. I prodotti PCR sono stati visualizzati ai raggi UV su un transilluminatore (Raaijmakers *et al.*, 1997).

1.4 Esperimenti in serra

Sono stati allestiti, in cella climatica, tre esperimenti che dovevano verificare e confermare l'efficacia del ceppo antagonista nei confronti del patogeno *in planta*.

1.4.1. Materiale vegetale usato negli esperimenti, tesi, inoculazioni e rilievi

Nel primo dei tre esperimenti, pomodori 'Moneymaker' sono stati distribuiti in tre blocchi randomizzati costituiti da 4 piante. Le piante allo stadio di tre foglie sono state espantate, potate alle radici e messe a bagno per 10 minuti in una sospensione acquosa (ca. 10^8 cfu/ml) del

ceppo IPV-BO G19, fatto crescere 24 ore prima su KB-agar, e in acqua deionizzata sterile come controllo. Due giorni più tardi, mediante bisturi, sono state fatte 6-7 ferite alle radici, i vasi sono stati irrigati con 60 ml di una sospensione acquosa (ca. 10^8 cfu/ml) di *R. solanacearum* ceppo IPV-BO 5836. Dal settimo giorno dopo l'inoculazione con il patogeno fino al ventunesimo sono stati fatti rilievi giornalieri contando il numero di piante sintomatiche rispetto a quello di piante totali (% piante infette).

Nel secondo esperimento si è proceduto come nel primo usando però 4 blocchi randomizzati di 6 piante ed i rilievi sono stati portati fino al venticinquesimo giorno.

Nel terzo esperimento sono state usate quattro tesi: Bion (150 ppm), applicato mediante nebulizzazione fogliare 14 giorni prima dell'inoculazione, IPV-BO G19 applicato 2 giorni prima dell'inoculazione nel medesimo modo del primo esperimento ed infine sono stati usati due controlli positivi (acqua): in una tesi applicata per nebulizzazione sulle foglie (acqua S o WS), nell'altra tesi applicata con taglio alle radici e bagno radicale come la sospensione a base di IPV-BO G19 (acqua R o WR). I rilievi sono proseguiti fino al dodicesimo giorno dopo l'inoculazione. I dati di tutti e tre gli esperimenti sono stati elaborati mediante ANOVA test (Duncan's, $p < 0,05$). In tutti e tre gli esperimenti il patogeno è stato reisolato dalle piante sintomatiche su TZ agar (vedi APPENDICE) ed è stato identificato con saggio PCR (Seal *et al.*, 1993) fatto sia sulle colonie purificate che direttamente sugli estratti vegetali.

2. RISULTATI

2.1. Saggi *in vitro*

Il ceppo IPV-BO G19 è risultato efficace nell'inibire *R. solanacearum* in entrambe le metodologie saggate, con aloni di inibizione di ca. 6-7 cm totali.

2.2. Meccanismi d'azione

La capacità di inibire *in vitro* lo sviluppo di *R. solanacearum* è stata annullata con aggiunta di enzimi proteolitici quali pronasi e proteinasi K: ciò ha evidenziato la sensibilità di tali composti alle proteasi (*Fig. 1*). Nessuna risposta invece è stata notata nell'area attorno al foro dove erano stati aggiunti gli ioni Fe^{+++} ; il ceppo quindi non produce siderofori.

2.3. Verifica molecolare per produzione di 2,4 DAPG e PCA

La verifica della presenza degli operoni responsabili della sintesi di 2,4 DAPG e PCA, ha avuto esito negativo (*Fig. 2*).

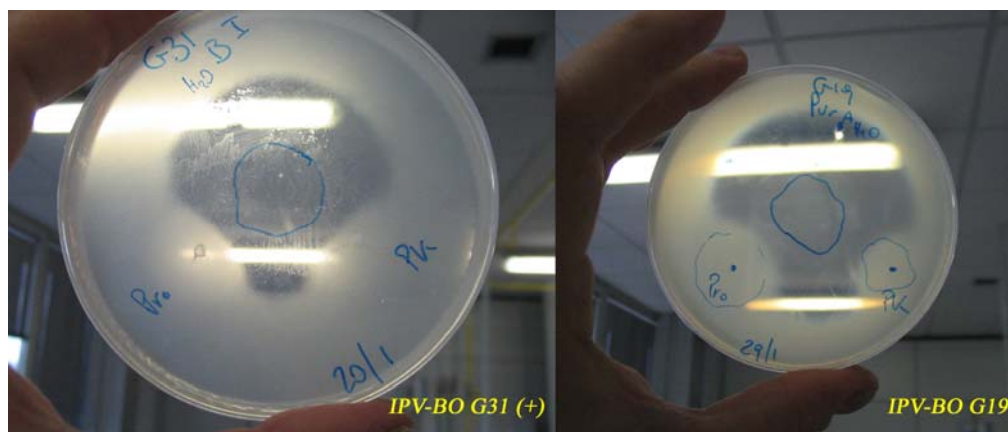
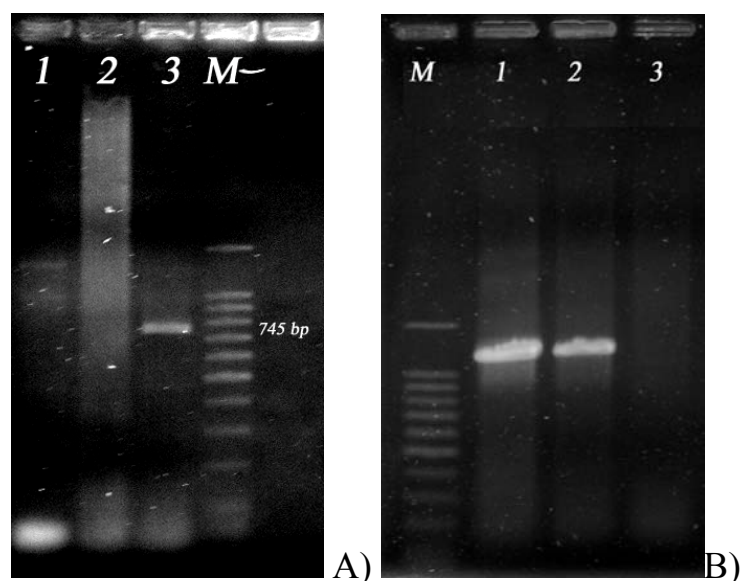


Figura 1: meccanismo d'azione dei ceppi IPV-BO G31, controllo positivo per la sintesi di molecole antibiotiche sensibili alle proteasi, ed IPV-BO G19.



*Figura 2: A) Sintesi di 2,4 DAPG: 1. DNA di G19; 2. Sospensione cellulare di G19; 3. DNA del ceppo P60 (*P. fluorescens*; controllo positivo). B) Sintesi di PCA: 1. DNA di Phz24 (controllo positivo); 2. DNA di Phz26 (controllo positivo); 3. DNA di G19; M. Marker 100 bp (Promega).*

2.4. Esperimenti in serra

In tutti e tre gli esperimenti si è potuta notare un'efficacia significativa del ceppo antagonista IPV-BO G19 nei confronti *R. solanacearum*

PRIMO ESPERIMENTO:

Dopo dieci giorni dall'inoculazione provocatrice radicale, l'incidenza della malattia è risultata crescente sia nelle piante trattate con il ceppo IPV-BO G19 che in quelle di controllo. Le piante di controllo sono rimaste asintomatiche fino a circa 6 giorni, ma nei 3 giorni successivi collasso ed avvizzimento progredivano rapidamente tanto che l'incidenza già al decimo giorno era 80%. Le piante trattate rimanevano asintomatiche fino all'ottavo giorno e nei giorni successivi l'incidenza aumentava gradualmente raggiungendo la soglia di 80% solo dopo 21 giorni.

Graficamente i dati sperimentali sono stati interpolati da due tratti di curva logaritmica. Il tracciato per le piante trattate è rimasto costantemente inferiore a quello delle piante di controllo (*Fig. 3*).

L'analisi statistica dei dati ha mostrato che dopo 9 giorni l'incidenza relativa del trattamento con IPV-BO G19 ("a"; 0%) non è risultato confrontabile con il controllo ("b"; 41,7%). Dopo 21 giorni tra il trattamento con IPV-BO G19 ed il controllo non vi sono state differenze significative fra le incidenze ("a"; rispettivamente 41,7 e 61,7%) (*Fig. 4*).

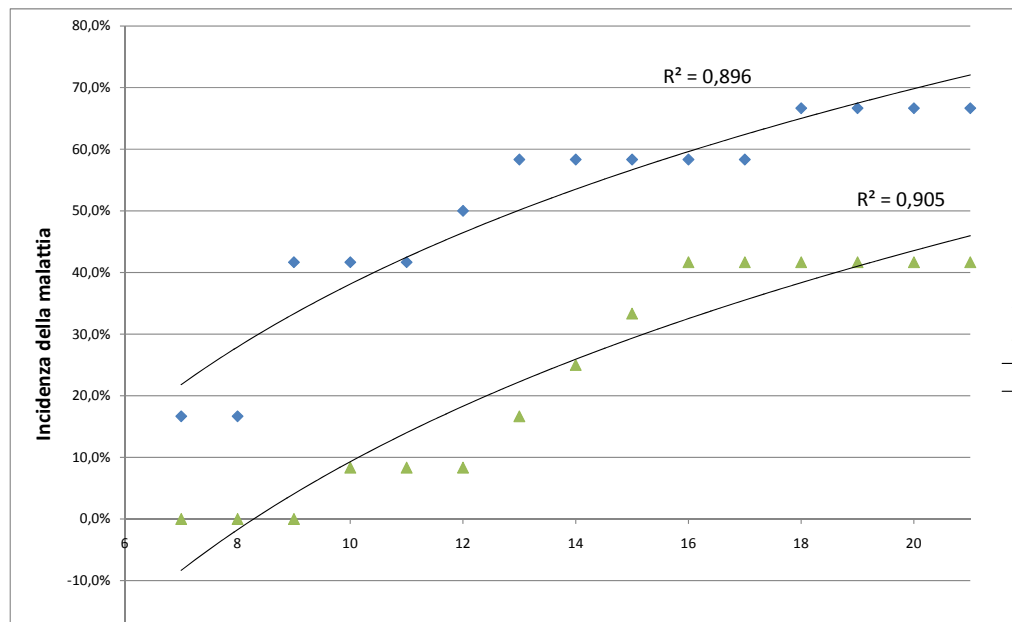


Figura 3: progressione dell'incidenza della malattia nel primo esperimento fino a 21 giorni dall'inoculazione.

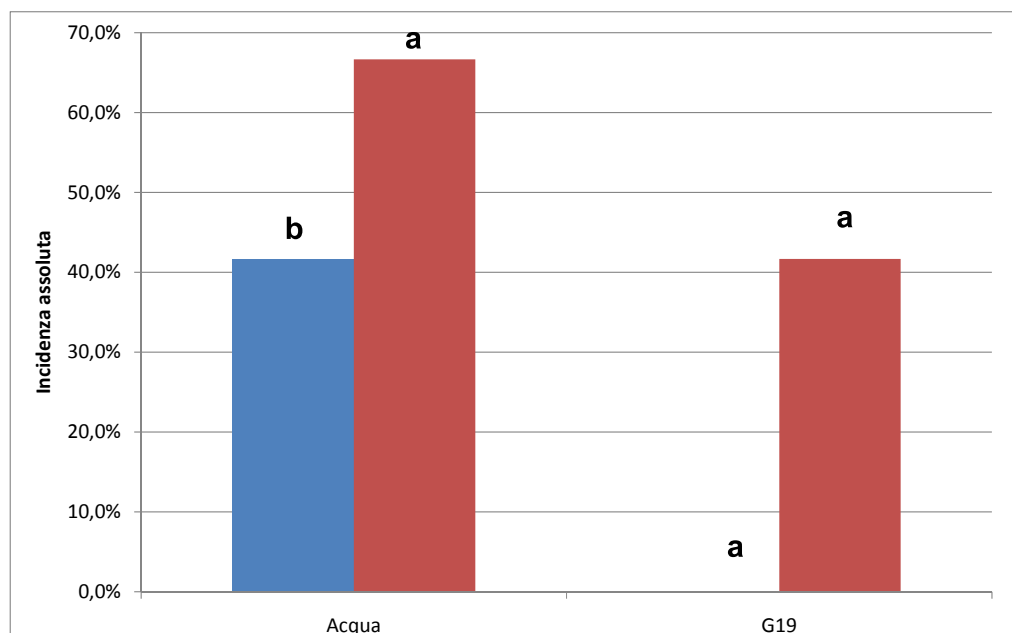


Figura 4: istogrammi mostranti nel primo esperimento l'incidenza della malattia a 9 e 21 giorni dall'inoculazione (Duncan, $p < 0,05$).

SECONDO ESPERIMENTO:

Da 8 a 25 giorni dopo l'inoculazione provocatrice, l'incidenza della malattia è risultata crescente sia nelle piante trattate con il ceppo IPV-BO G19 che in quelle di controllo (*Fig. 5*). Le piante di controllo sono rimaste asintomatiche fino a 6 giorni, ma nei 4 giorni successivi, la sindrome si aggravava e l'incidenza assoluta raggiungeva l'83,3%, dopo il 22° giorno si aggirava intorno all'87,5% per rimanere tale fino al 25° giorno.

Le piante trattate con IPV-BO G19 sono rimaste asintomatiche fino a 7 giorni, successivamente la situazione si aggravava fino a raggiungere il 79,2%, ma solo dopo 25 giorni.

Graficamente i dati sperimentali sono stati interpolati da due tratti di curva logaritmica. Il tracciato per le piante trattate è rimasto costantemente inferiore a quello delle piante di controllo (*Fig. 5*)

L'analisi statistica dei dati ha mostrato che dopo 7 giorni di rilievi l'incidenza relativa del trattamento con IPV-BO G19 ("a"; 0%) non è risultato confrontabile con il controllo ("b"; 29,2%). Dopo 21 giorni tra il trattamento con IPV-BO G19 ed il controllo non vi sono state differenze significative fra le incidenze ("a"; rispettivamente 66,7 e 83,3%) (*Fig. 6*).

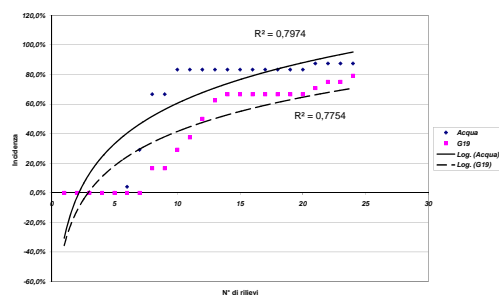


Figura 5: progressione dell'incidenza della malattia nel secondo esperimento fino a 25 giorni dall'inoculazione.

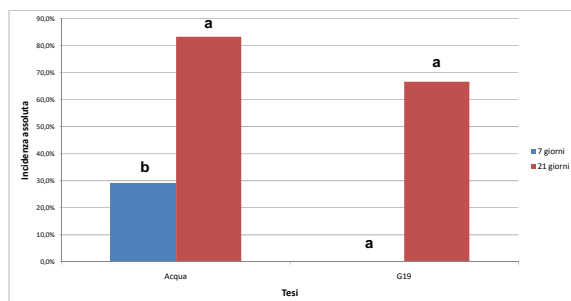


Figura 6: istogrammi mostranti l'incidenza della malattia nel secondo esperimento a 7 e 21 giorni dall'inoculazione (Duncan, $p < 0,05$).

TERZO ESPERIMENTO

Da 6 a 12 giorni dopo l'inoculazione provocatrice, l'incidenza della malattia è risultata crescente sia nelle piante trattate con il ceppo IPV-BO G19 che in quelle di controllo (*Fig. 7*). Le piante di controllo (Bion, acqua S ed acqua R) sono rimaste di nuovo asintomatiche fino a 4 giorni, ma nei 4 giorni successivi, la sindrome si aggravava e l'incidenza raggiungeva rispettivamente il 41,7, l'83 ed il 100% dopo 8 giorni.

Le piante trattate con IPV-BO G19 sono rimaste asintomatiche rispettivamente fino a 5 giorni; nei giorni successivi l'incidenza aumentava gradualmente e, superava dopo 12 giorni la soglia di 80%, ma anche dopo 12 giorni non superava il 100%. Graficamente i dati sperimentali sono stati interpolati da tratti di curva logaritmica. Il tracciato per le piante trattate con Bion e IPV-BO G19 è rimasto costantemente inferiore a quello delle piante di controllo (*Fig. 7*)

L'analisi statistica dei dati ha mostrato a 5 giorni dall'inoculazione il ceppo G19 ("a") non è risultato confrontabile con i controlli (acqua R "b" ed acqua S "c"), invece non si è discostato molto dal trattamento con Bion ("a"). Dopo 7 giorni tra i trattamenti con G19 e Bion non vi sono state differenze significative ("a"), mentre questi trattamenti non sono risultati confrontabili con acqua ("b"). Dopo 9 giorni tra G19, Bion e i due controlli con acqua non sono risultate differenze significative ("a") (*Fig. 8*).

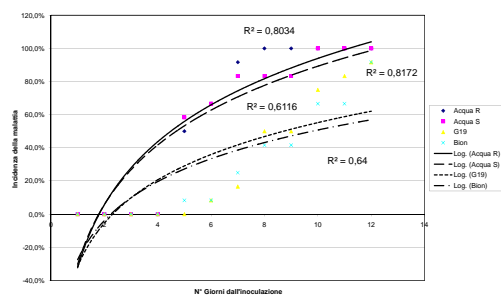


Figura 7: progressione dell'incidenza della malattia nel terzo esperimento fino a 12 giorni dall'inoculazione.

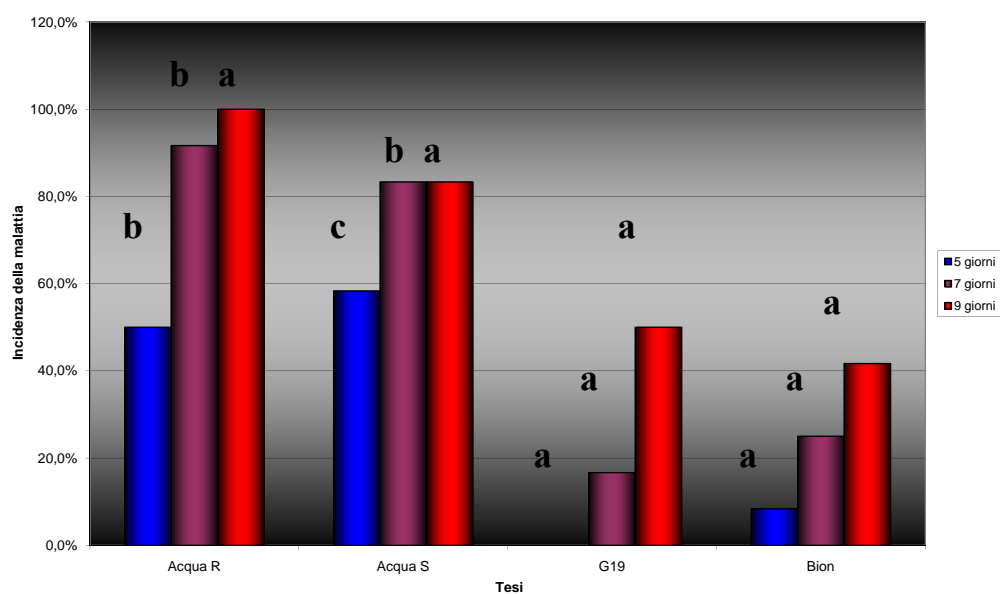


Fig. 8: Istogrammi mostranti l'incidenza della malattia nel terzo esperimento a 5, 7 e 9 giorni dall'inoculazione (Duncan, p 0,05).

Nei primi due esperimenti, il patogeno è stato reisolato su TZ e le colonie purificate sono state tutte identificate con saggio PCR non solo dalle piante sintomatiche a scopo di verifica, ma anche da molte delle piante rimaste asintomatiche, sia quelle trattate con l'antagonista che quelle di controllo trattate con acqua; le PCR identificative fatte sugli estratti vegetali però, hanno mostrato differenze fra le piante di controllo e le piante trattate con IPV-BO G19: infatti, mentre nel primo caso i risultati sono stati positivi per tutti i campioni saggiati, nel secondo caso poche volte è stato possibile notare la positività del saggio (dati non mostrati).

3. DISCUSSIONE

I risultati, nel 1° esperimento, mostrano che a 9 giorni dall'inoculazione le piante trattate con IPV-BO G19 non hanno presentato sintomi mentre l'incidenza della malattia sulle piante trattate con acqua si è aggirata intono al 42%; dopo 21 giorni, invece, i risultati dei due trattamenti sono confrontabili.

Nel 2° esperimento, dopo 7 giorni dall'inoculazione, l'incidenza percentuale del trattamento con il ceppo G19 (17%) differisce significativamente da quella del controllo (67%), mentre, sempre dopo 21 giorni i risultati dei due trattamenti sono confrontabili come nel 1° esperimento.

Nel 3° esperimento il decorso della malattia è stato molto più rapido, infatti dopo 5 giorni di rilievi il ceppo antagonista ha avuto incidenza percentuale nulla significativamente differente da quella dei

controlli trattati con acqua (50 e 58%) e si è discostata di poco dall'incidenza ottenuta dall'induttore di resistenza Bion (8%).

Il ritardo della comparsa dei sintomi è stato verosimilmente conseguenza di un rallentamento della colonizzazione endofita del batterio indotto dai due trattamenti. Dopo nove giorni tra i trattamenti con G19, Bion e acqua non vi sono state differenze significative.

I dati di lotta biologica *in planta* hanno confermato le evidenze sperimentali ottenute con i saggi *in vitro*, ciò indica che il ceppo IPV-BO G19 abbia un ruolo attivo nell'inibizione del patogeno (Lemessa F. e Zeller W., 2007; Ran *et al.*, 2005).

I saggi PCR sugli estratti vegetali dei pomodori trattati con IPV-BO G19 siano risultati positivi solo in qualche caso, mentre il reisolamento su substrato semi-selettivo ha avuto successo in quasi tutti i campioni saggiati ciò suggerisce che le popolazioni endofite del patogeno siano rimaste sotto la soglia di sensibilità della PCR. Due interpretazioni sono possibili: il ceppo IPV-BO G19 può aver limitato le popolazioni del patogeno prima della penetrazione (Lemessa F. e Zeller W., 2007), oppure il ceppo antagonista ha agito da induttore di resistenza, favorendo la capacità della pianta nell'attuazione di difese postinfettionali efficaci nel prevenire l'ancoramento o a limitare il livello delle sue popolazioni nello xilema (Haas D. e Keel C., 2003).

Per quanto riguarda lo studio dei meccanismi d'azione, i risultati mostrano che IPV-BO G19 *in vitro* è capace di sintetizzare una molecola sensibile alle proteasi attiva nei confronti di *R. solanacearum*; i saggi PCR fatti per verificare la presenza degli operoni responsabili della sintesi di due dei polichetidi più importanti, 2,4 DAPG e PCA, sono risultati negativi confermandone l'assenza. L'indagine su enzimi chiave per la sintesi degli altri due polichetidi importanti, pioluteorine e

pirrolnitrine tuttavia, non è stata fatta e permane il dubbio che il ceppo antagonista possa o meno produrle.

Per saggiare l'eventuale attività indiretta, quindi la reazione mediata dall'ospite ed attivata dal batterio antagonista si procederà nel prossimo capitolo allo studio molecolare delle possibili risposte di difesa indotte.

4. BIBLIOGRAFIA

Boucher C.A., Gough C.L., Arlat M., 1992. Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphases on hrp genes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 443–461.

Ciampi-Panno L., Fernandez C., Bustamante P., Andrade N., Ojeda S., Conteras, A., 1989. Biological control of bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* 66: 315–332.

Dong C., Zeng X., Liu Q., 1999. Biological control of tomato bacterial wilt with avirulent bacteriocinogenic strain of *Ralstonia solanacearum*. *J. Sci. China Agric. Univ.* 20: 1–4.

El Albyad M.S., el Sayed M.A., el Shanshoury A.R., 1996. Effect of culture conditions on the antimicrobial activities of UV-mutants of *Streptomyces corchorusii* and *S. spiroverticillatus* against bean and banana wilt pathogens. *Microbiol. Res.* 151: 201–211.

Elphinstone J.G., 1992. Virulence of isolates of *Pseudomonas solanacearum* from worldwide sources in resistant and susceptible tomato cultivars. In: Prior, P., Bart, S., Leclercq, S., Darrasse, A., Anais, G. (Eds.), Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas* (Burkholderia) *solanacearum* in the stem tissues. Plant. Pathol. 45 720–726.

Guo J.H., Guo Y.H., Zhang L.X., Qi H.Y., Fang Z.D., 2001. Screening for biocontrol agents against cayenne pepper bacterial wilt. China J. Biol. Control 17: 101–106.

Haas D., Keel C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 2003. 41: 117–53.

Hayward A.C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Phytopathol. 29: 65–87.

Galasso O., Sponza G., Bazzi C. and Vanneste J. L., 2002. Characterisation of two fluorescent strains of *Pseudomonas* as biocontrol agents against fire blight. Acta Hort. 590: 299-307.

Lemessa F., Zeller W., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Science Direct, Biol. Control 42: 336–344.

McLaughlin R.J., Sequeira L., Weingartner D.P., 1990. Biocontrol of bacterial wilt of potato with an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*: interactions with root-knot nematodes. Am. Potato J. 67: 93–107.

Raaijmakers J. M., Weller D. M., Thomashow L. S., 1997. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments. Appl. Environ. Microb. 63: 881-887.

Ran L.X., Liu C.Y., Wu G.J., van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp in. China. Biol. Control 32: 111–120.

Silveira E.B., Da R., Mariano de L.R., Michereff S.J., 1995. Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Pseudomonas solanacearum* and effect on tomato seedling growth. Fitopathol. Brasil 20: 605–612.

Vanneste, J.L., Yu, J. and Beer, S.V. 1992. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. J. Bacteriol. 174: 2785-2796.

CAPITOLO IV

STUDIO MOLECOLARE DELLE RISPOSTE DI DIFESA IN POMODORO

1. INTRODUZIONE

Le piante producono diverse sostanze antifungine per contrastare l'insorgere ed il progredire di un'infezione da parte di funghi patogeni. Le proteine da patogenesi sono parte di queste sostanze fungitossiche e alcune possono essere anche considerate come marcatori sia di SAR sia di ISR, risposte sistemiche mediate rispettivamente, dall'incremento di acido salicilico e, acido jasmonico ed etilene.

1.1. Proteine da patogenesi (PRs) associate alle risposte di difesa della pianta

Nelle interazioni ospite-patogeno sia eterologhe sia omologhe incompatibili, tutti i danni tissutali causati dal patogeno sono limitati in virtù delle rapide risposte di difesa messe in atto dalla pianta nella fase determinativa del riconoscimento. Le proteine da patogenesi ("Pathogenesis Related Proteins", PRs), rappresentano un importante aspetto dei meccanismi di difesa della pianta. Esse sono proteine codificate dalla pianta ed indotte in maniera specifica quando essa è attaccata da un patogeno o, in generale, è sottoposta ad uno stress, che può essere anche abiotico. Una loro peculiarità è quella di venire

indotte e prodotte non solo localmente, nel punto in cui ha operato lo stress, ma anche nel resto della pianta e, tradizionalmente si ritengono associate alla resistenza sistemica acquisita (SAR). L'induzione delle PRs è stata riscontrata in diverse specie vegetali, appartenenti a famiglie tassonomicamente differenti e ciò fa supporre che tali proteine abbiano un ruolo importante e generalizzato nella difesa delle piante dai patogeni (Van Loon e Van Strien, 1999).

I primi rappresentanti di questa categoria di molecole sono stati isolati e determinati nel 1970 in foglie di tabacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN e Xanthi nc), dopo l'infezione con il virus del mosaico del tabacco (Gianinazzi *et al.*, 1970; Van Loon e Van Kammen, 1970). Da allora, molte proteine con simili proprietà sono state isolate da tabacco ed anche da altre specie di piante, sia monocotiledoni che dicotiledoni.

Le proteine PR hanno di regola la proprietà di resistere a pH acidi ed a tagli proteolitici in modo tale da rimanere intatte nell'ambiente dove sono abitualmente localizzate: vacuolo, parete cellulare od apoplasto (Niderman *et al.*, 1995).

Originariamente in tabacco vennero caratterizzate cinque principali classi di PRs, successivamente, nel 1994, venne proposta una nomenclatura unificatrice basata sulla suddivisione di queste proteine in famiglie, aventi la medesima sequenza aminoacidica, le stesse caratteristiche biochimiche e sierologiche nonché attività enzimatiche e biologiche (Van Loon *et al.*, 1994). Attualmente sono suddivise in 17 famiglie (Van Loon *et al.*, 2006).

Tabella 1: famiglie delle proteine di patogenesi attualmente conosciute

Famiglie	Membro tipo	Proprietà
PR-1	Tabacco PR-1a	antifungina
PR-2	Tabacco PR-2	β -1,3-glucanasi
PR-3	Tabacco P, Q	chitinasi tipo I,II, IV,V,VI,VII
PR-4	Tabacco 'R'	chitinasi tipo I,II
PR-5	Tabacco S	Taumatina simile
PR-6	Inibitore I in Pomodoro	Inibitore proteinasi
PR-7	Pomodoro P ₆₉	endoproteinasi
PR-8	Chitinasi in Cetriolo	chitinasi tipo III
PR-9	Tabacco 'perossidasi formante lignina'	perossidasi
PR-10	Prezzemolo 'PR1'	'ribonucleasi-simile'
PR-11	Tabacco 'classe V' chitinasi	chitinasi, tipo I
PR-12	Radicchio Rs-AFP3	difensina
PR-13	Arabidopsis THI2.1	tionina
PR-14	LTP4 Orzo	Proteina trasferimento lipidi
PR-15	OxOa Orzo	ossalato ossidasi
PR-16	OxOLP Orzo	'ossalato ossidasi-simile'
PR-17	Tabacco PRp27	sconosciuta

1.3. Famiglie di proteine PR

1.3.1. PR-1

Le proteine da patogenesi appartenenti alla famiglia delle PR-1 rappresentano un gruppo consistente indotto da patogeni e dall'acido salicilico e, di conseguenza, sono frequentemente utilizzate come marcatori per la SAR. La PR-1a acida da *Nicotiana tabacum* è stata la prima ad essere purificata e caratterizzata e, da allora, è stata presa come capostipite della famiglia PR-1 (Van Loon e Van Strien, 1999). Da quando sono state individuate negli anni '70, molti ricercatori hanno tentato di accertare con scarso successo quale fosse la loro funzione nelle piante. In transgeniche di tabacco, esprimenti alti livelli di PR-1a, c'è una significativa riduzione di sintomi da *Peronospora tabacina* e *Phytophthora infestans* var. *nicotianae* e ciò ha fatto attribuire alla PR-1 attività antifungina (Niderman *et al.*, 1995). Ulteriori studi hanno confermato questa funzione: le PR-1 espletano attività antifungina a concentrazioni micromolari, sia *in vitro* che *in planta* contro altri patogeni fungini, quali *Uromyces fabae* e *Erysiphe graminis*. Il loro accumulo postinfettionale è stato rilevato in riso, grano, mais, tabacco, *Arabidopsis thaliana* e in molte altre specie vegetali. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, è stato ipotizzato che l'attività antifungina si esprima attraverso l'interazione con proteine associate ai canali del calcio (Ca^{2+}) (Selitrennikoff, 2001).

1.3.2. PR-2

I membri della famiglia delle PR-2 sono β -1,3-glucanasi monomeriche (glucan endo-1,3-glucosidasi), con massa molecolare di 25-35 kDa, catalizzanti il taglio idrolitico dei β -1,3-glucani, molecole abbondanti nella parete cellulare vegetale e in quella dei funghi. Sono raggruppate in due classi: le glucanasi della classe I, proteine basiche a localizzazione vacuolare; le glucanasi di classe II, acide a localizzazione apoplastica. Si pensa che il loro ruolo per la difesa consista nel degradare la parete cellulare dei funghi idrolizzando i β -1,3-glucani. Sono state trovate in numerose piante e *in vitro* hanno attività antifungina contro funghi di vario tipo (Breiteneder, 2000; Selitrennikoff, 2001); sono anche implicate in altri processi fisiologici delle piante, come germinazione del polline, maturazione dei frutti, germinazione dei semi e mobilizzazione e stoccaggio di sostanze di riserva nell'endosperma delle cariossidi dei cereali. Inoltre, esse sono indotte anche in risposta a stress fisici, quali ferite, freddo, ozono e radiazioni UV-B (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

1.3.3. PR-3

Alla famiglia delle PR-3 appartengono proteine enzimatiche della categoria delle chitinasi. Questo tipo di enzimi nelle piante sono frequentemente endochitinasi e idrolizzano la chitina, componente principale dell'esoscheletro degli insetti e della parete cellulare dei funghi. Neuhaus *et al.* (1991) hanno raggruppato le chitinasi in sette

classi denominate da I a VII in base alla sequenza amminoacidica e le PR-3 sono riferite alle classi I, II e IV.

Queste chitinasi hanno mostrato attività antifungina *in vitro* verso vari funghi, quali *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rizoctonia solani* e *Botrytis cinerea* (Selitrennikoff, 2001; Hoffmann-Sommergruber, 2002).

1.3.4. PR-4

Due tipi di proteine PR-4 isolate da foglie di tabacco infettate dal TMV sono state identificate come proteine leganti la chitina (“chitin-binding proteins”), composte da due polipeptidi di peso molecolare da 13 a 15 KDa. Mostrano potente attività antifungina contro molti patogeni fungini e si è ipotizzato operino attraverso il legame con la chitina della parete ifale in accrescimento con conseguente alterazione della polarità cellulare e blocco della crescita dell’ifa (Selitrennikoff, 2001; Hoffmann-Sommergruber, 2002).

1.3.5. PR-5: simili a taumatina (TLPs)

La taumatina è una proteina estraibile dai frutti dell’arbusto africano *Thaumatococcus daniellii* ed ha un sapore particolarmente dolce. Tutte le proteine da patogenesi della famiglia PR-5 presentano una sequenza amminoacidica simile a quella della taumatina, anche se

non presentano il caratteristico sapore e, per questo, vengono denominate proteine simili alla taumatina, TLPs.

Le TLPs sono state rinvenute nelle foglie di varie piante, come *A. thaliana*, soia, riso, grano, tabacco, pomodoro, fagiolo e molte altre; esse si accumulano rapidamente nella pianta a seguito di stress biotici e abiotici e potrebbero avere un ruolo nella difesa della pianta. Infatti, presentano forte attività antifungina ed è stato ipotizzato il meccanismo d'azione consista nel loro inserimento nella membrana cellulare del fungo a formare un poro transmembrana causa di perdita di acqua ed elettroliti cui segue la lisi cellulare (Selitrennikoff, 2001; Hoffmann-Sommergruber, 2002).

1.3.6. PR-6 e PR-7

Le proteine appartenenti alla famiglia delle PR-6 sono degli inibitori di proteinasi e possono essere coinvolte nella difesa della pianta contro insetti ed altri erbivori, vari microrganismi e nematodi.

E' stata caratterizzata una sola PR-7 in pomodoro, dove agisce da endoproteinasi. Si pensa che il meccanismo d'azione antifungino operi attraverso degradazione di proteine di parete cellulare. E' probabile che la PR-7 possa avere un ruolo accessorio nel bloccare il processo infettivo da funghi (Van Loon e Van Strien, 1999).

1.3.7. PR-8 e PR-11

Anche le proteine delle famiglie 8 e 11 sono delle chitinasi: le prime facenti parte della classe III, le seconde della classe I delle chitinasi (Van Loon e Van Strien, 1999).

1.3.8. PR-9

Nella famiglia 9 delle proteine da patogenesi sono state incluse le perossidasi, importanti enzimi coinvolti nella difesa delle piante, oltreché nello sviluppo e nella crescita. In particolare, le perossidasi incluse nelle PR-9 sono coinvolte nella formazione della lignina per l'ispessimento della parete cellulare e nei processi ossidativi attivati in seguito all'invasione di un patogeno (Breiteneder, 2000).

1.3.9. PR-10

La famiglia delle PR-10 è strutturalmente riferibile a ribonucleasi. Questo tipo di proteine è stato isolato in molte piante, come asparago, prezzemolo, fagiolo, pisello, patata e melo; quelle estratte dal ginseng hanno mostrato di avere attività ribonucleasica.

Sono codificate da una famiglia genica, designata *Ypr10* da van Loon e van Strien (1999) e molti di questi geni vengono attivati a seguito di attacco da patogeni, contatto con elicitori fungini, ferita e altri stress (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

1.3.10. PR-12, PR-13 e PR-14

Recentemente, in molte piante sono stati identificati peptidi ad attività antimicrobica, denominati defensine, tionine e proteine per il trasferimento dei lipidi (“Lipid transfer proteins”, LTPs). In molte piante queste molecole sono indotte a seguito di contatto con patogeni e, per questo, esse potrebbero essere incluse nella categoria delle proteine da patogenesi. Al Quinto Workshop Internazionale sulle Pathogenesis-Related Proteins nelle piante (1998), è stato proposto di includerle in tre nuove famiglie di PRs: PR-12 per le defensine, PR-13 per le tionine e PR-14 per le LTPs. Le proteine delle tre famiglie hanno mostrato attività antifungina e antibatterica e sembrano avere i loro bersagli associati alla membrana cellulare (Van Loon e Van Strien, 1999). Le PR-14 sono chiamate proteine per il trasferimento dei lipidi dato che trasferiscono fosfolipidi dai liposomi ai mitocondri; sono proteine di 9 kDa localizzate nella parte esterna della membrana mitocondriale. Sono proteine largamente distribuite nel regno vegetale (Breiteneder, 2000).

1.3.11. PR-15 e PR-16

Queste due PRs sono tipiche delle monocotiledoni e comprendono famiglie di proteine riferibili ad ossalato ossidasi ed ossalato ossidasi con attività superossido dismutasica; generano perossido di idrogeno potenzialmente tossico direttamente sul patogeno o direttamente od

indirettamente attivatore di risposte di difesa nella pianta (Van Loon *et al.*, 2006).

1.3.12. PR-17

Questa famiglia di proteine di patogenesi è stata scoperta in tabacco, frumento ed orzo; sembra che la funzione chimica sia simile a quella delle proteinasi, anche se ufficialmente la funzione è sconosciuta (Van Loon *et al.*, 2006).

Il seguente capitolo tratta di esperimenti condotti in laboratorio per caratterizzare la risposta immunitaria delle piante di pomodoro trattate con il ceppo antagonista IPV-BO G19 come induttore, monitorando l'espressione dei geni di PR quali: PR-1a, PR-4, PR-5 e chitinasi basica intracellulare (CHT1).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Materiale vegetale, esperimenti in cella climatica, raccolta campioni

1° ESPERIMENTO (preliminare)

Sono stati usati pomodori 'Moneymaker' trapiantati singolarmente in vasetti e distribuiti in blocchi randomizzati (due piante/due repliche

per tesi)(Fig. 1); una volta giunti alla fase fenologica di terza foglia i pomodori sono stati trattati. È stata fatta una sospensione acquosa (ca. 10^8 cfu/ml) con il ceppo IPV-BO G19, cresciuto per 24 ore a 27°C su KB agar (vedi APPENDICE); di seguito, i pomodori sono stati delicatamente espantati e messi a bagno nella sospensione contenente il batterio antagonista per 10 minuti. Successivamente le piante sono state reimpiantate ed irrigate con 50 ml della medesima sospensione. Bion (controllo positivo) alla concentrazione di 150 ppm è stato distribuito sui pomodori mediante aspersione; infine acqua è stata usata come controllo negativo applicandola in un caso per aspersione (**WS**), nell'altro (**WR**) nel medesimo modo di applicazione del ceppo IPV-BO G19. In seguito, sono state prelevate le prime due foglie apicali di ogni pianta a tempi diversi dal momento del trattamento (0, 24, 48 ore, 6, 10 giorni); queste sono state immediatamente congelate in azoto liquido (N_2) e conservate in supercongelatore a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA totale.

2° ESPERIMENTO

Sono stati usati sempre pomodori 'Moneymaker' in numero di una pianta per due repliche/tesi (a blocchi randomizzati) e fatti arrivare alla fase fenologica di terza foglia ed infine trattati con il medesimo procedimento e con gli stessi trattamenti usati nel primo esperimento (**WR**, **WS**, **G19 T** (IPV-BO G19 vivo trattato con immersione radicale); in questa fase però sono state aggiunte due nuove tesi: una sospensione (ca. 10^8 cfu/ml) del ceppo IPV-BO G19 applicata senza immersione radicale ma tramite semplice irrigazione (100 ml) (**G19 A**) ed una sospensione (ca. 10^8 cfu/ml) di cellule sottoposte a tindalizzazione (bollitura a bagnomaria per 45 minuti ripetuta per tre

giorni) ed a due lavaggi in soluzione fisiologica 0,85% (vedi APPENDICE) e due lavaggi in acqua distillata sterile (ogni lavaggio è costituito in una centrifugazione della sospensione cellulare a 10000g per 15 minuti a 4°C e la seguente risospensione del pellet nel liquido di lavaggio successivo) applicata mediante bagno radicale (**G19 Tm**). Per il campionamento e la conservazione si è proceduto come per il primo esperimento fatta eccezione per gli intervalli di raccolta dei campioni: 0, 24, 48, 72 e 96 ore.



Figura 1: pomodori 'MoneyMaker' disposti in blocchi randomizzati.

2.2. Estrazione RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA totale dalle foglie di pomodoro è stato usato il kit Qiagen RNeasy Plant minikit (cat.: N° 74904) con il seguente protocollo.

Sono stati pesati ca. 95 mg di materiale fogliare precedentemente conservato a -80°C , trasferiti in mortaio e macerati con pestello ed azoto liquido, e poi si è aggiunto 1 ml di tampone d'estrazione (vedi APPENDICE), macerando fino ad una completa omogeneizzazione; il tutto è stato trasferito in eppendorf da 2 ml e centrifugato per 5 minuti a $17500g$ (T° ambiente). È stato prelevato 1 ml di surnatante e posto in eppendorf da 1,5 ml, vi sono stati aggiunti 100 μl di Na-Lauroyl Sarcosina al 30% (vedi APPENDICE), il tutto è stato ben miscelato per inversione ed incubato per 10 minuti a 70°C . In seguito, il volume totale ancora caldo è stato posto in una colonna QIAshredder (colore viola) posta a sua volta in eppendorf da 2 ml e centrifugato per 2 minuti a $17500g$ (questo passaggio permette di rimuovere la maggior parte dei residui cellulari); l'eluato ottenuto è stato trasferito in eppendorf da 1,5 ml evitando di disturbare l'eventuale pellet formatosi. Successivamente, si è proceduto alla pulizia di tale eluato aggiungendovi 0,5 volumi (500 μl) di etanolo assoluto freddo e miscelando bene per inversione fino ad omogeneizzare il tutto. In seguito, 700 μl della miscela ottenuta sono stati trasferiti in una colonna RNeasy (colore rosa), posta precedentemente in una eppendorf da 2 ml, e centrifugati per 1 minuto a $9900g$; eliminato l'eluato, il procedimento è stato ripetuto una seconda volta usando la quantità rimasta ed utilizzando sempre la stessa colonnina (questo è stato necessario in quanto la colonnina non può contenere 1,5 ml della miscela ottenuta dal primo eluato + l'etanolo assoluto, quindi bisogna spezzare in due il procedimento usando ovviamente la stessa colonnina in modo da accumulare l'RNA estratto nella stessa). Sono stati aggiunti 700 μl del tampone di lavaggio RW1 direttamente alla colonna che è stata quindi centrifugata per 1 minuto a $9900g$; al termine, la colonna RNeasy è stata trasferita in un nuovo tubo da 2 ml, sono stati aggiunti 500 μl di tampone RPE ed il tutto

centrifugato per 1 minuto 9900g. Questa fase è stata ripetuta centrifugando però per 2 minuti, con l'intento di asciugare la colonna ogni residuo di etanolo che avrebbe potuto inibire le reazioni successive; per eliminare completamente i residui di etanolo presenti nell'estratto, la colonnina è stata posta in un nuovo tubo da 2 ml ed è stata centrifugata per 1 minuto a 14000 rpm. Infine, per eluire l'RNA totale (trattenuto dal gel di silice all'interno della colonnina), la colonna RNeasy è stata trasferita in eppendorf da 1,5 ml aggiungendo 100 µl di acqua distillata sterile trattata con DEPC (0,1%) (vedi APPENDICE) e centrifugata per 2 minuti a 9900g. L'RNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

2.3. Digestione con DNasi

Gli estratti da digerire sono stati scongelati tenendoli in ghiaccio, vortexati e centrifugati per 5 minuti a 15000g; sono poi stati prelevati 50 µl, dalla porzione superficiale, e vi sono stati aggiunti 6 µl di DNasi (RQ-1 RNase-Free DNase cod. M6101 PROMEGA), vortexati ed incubati per 30 minuti a 37°C. Sono stati poi aggiunti 60 µl di fenolo – cloroformio - alcol isoamilico (125:24:1, pH 5) (da diluire 5:1 in cloroformio:alcol isoamilico (24:1)), vortexati e centrifugati per 3 min. a 12000g (4°C). La fase acquosa superiore (surnatante, 50 µl) è stata trasferita in nuova provetta eppendorf da 0,5 ml alla quale è stato aggiunto 1 volume (55 µl) di cloroformio-isoamilico, vortexato e centrifugato per 3 min. a 12000g (4°C). La fase acquosa superiore (45 µl) è stata prelevata e trasferita in una nuova provetta eppendorf da 0,5 ml alla quale sono stati aggiunti 0,5 volumi di acetato di ammonio ($\text{CH}_3\text{COO}^- \text{NH}_4^+$, 7,5 M, vedi APPENDICE) e 2,5 volumi di etanolo al

100%; il tutto è stato miscelato per inversione e conservazione per 30 minuti a -70°C (altro modo di conservazione dell'RNA). Una volta avvenuta la precipitazione i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 12000 g (4°C); il pellet ottenuto è stato risospeso in etanolo al 70% (500 µl) e centrifugato per 10 minuti a 12000 g (4°C); per eliminare completamente i residui di etanolo presenti nell'estratto digerito, i campioni sono stati centrifugati per 1 minuto a 14000 rpm (4°C) e lasciati ad asciugare all'aria (al buio) per circa 15-20 minuti. Il pellet così ottenuto ed asciugato è stato risospeso in 45 µl di H₂O DEPC e conservato a -20°C (Bini *et al.*, 2008).

2.4. Controllo della qualità del RNA mediante gel elettroforesi

L'apparato di corsa è stato accuratamente pulito con detergente per eliminare eventuali RNasi (RNase AWAY, cat 10328-011, GIBCO BRL) oppure anche tenuto a bagno in NaOH 0,2 M per ca. 30 minuti e poi sciacquato con acqua distillata. È stato fatto un gel d'agarosio all'1,2-1,3% ed in ciascun pozzetto di questo sono stati caricati 5 µl di RNA totale; è stata avviata la corsa elettroforetica a 40 V per circa 100 minuti. Il gel è stato colorato in bromuro d'etidio per ca. 20 minuti e decolorato in acqua distillata per ca. 5 minuti

2.5. Determinazione quantitativa dell'RNA totale

1. Lettura allo spettrofotometro a 260 nm di lunghezza d'onda;
2. Lettura allo spettrofotometro a 280 nm di lunghezza d'onda;
3. Rapporto assorbanza 260/280 nm per il calcolo della purezza.
4. La concentrazione di RNA estratto è stata calcolata direttamente dallo spettrofotometro o in base alla seguente formula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Fd}^* \times 40$$

Fd=Fattore di diluizione

2.6. Analisi dell'espressione genica della pianta

Sono state usate le metodologie della Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) e della Real Time RT-PCR (Ginzinger, 2002) per valutare le variazioni di espressione dei geni coinvolti nella risposta resistente della pianta dopo il trattamento con Bion ed il ceppo IPV-BO G19. Tra i geni marcatori di resistenza indotta sono stati presi in considerazione i seguenti: PR-1 (marcatore SAR, Hamiduzzaman *et al.*, 2005), PR-4, PR-5 e chitinasi basica intracellulare (CHT1), le cui sequenze sono state reperite nella banca dati GenBank National Centre for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.6.1. Uso del controllo endogeno per quantificare il livello di RNA messaggero

Per le analisi di espressione genica fatte con RT-PCR e Real Time RT-PCR, si fa spesso uso di un controllo endogeno o interno, cioè di un gene espresso costantemente nella cellula studiata e non influenzato dai trattamenti sperimentali. Il segnale proveniente da questo controllo interno può essere vantaggiosamente usato per normalizzare il segnale emesso dai campioni in esame, in quanto occorre sempre tener presente la possibilità di errore nei prelievi con pipetta automatica, diverse efficienze di retrotrascrizione ed amplificazione, diversa qualità dell'RNA da campione a campione che, nell'insieme, possono inficiare sui risultati ottenuti. Nel caso della RT-PCR il controllo endogeno scelto viene amplificato contemporaneamente al gene saggiato ('target') mettendo nella miscela di reazione entrambe le coppie di inneschi o primer: si parla pertanto di RT-PCR in multiplex (Bustin, 2000). Nel caso della Real Time RT-PCR (chimica SYBR GREEN) il controllo interno non viene saggiato insieme al gene 'target' bensì, entrambi, vengono esaminati separatamente ed i dati vengono analizzati mediante formule matematiche (vedi Paragr. 2.6.4.7.).

2.6.2. Saggio dell'espressione genica mediante RT-PCR

Dai campioni di RNA totale estratto dalle foglie di pomodoro è stato ottenuto il DNA copia (cDNA) mediante trascrizione inversa con l'enzima trascrittasi inversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, cod. 1705, Promega). Per ottenere la

sintesi del primo filamento di DNA sono stati usati primer casuali (random). Contemporaneamente ai geni da saggiare, è stato amplificato anche il controllo endogeno, necessario per valutare l'utilizzo di quantità equivalenti di RNA per ogni campione e, in generale, per determinare l'efficienza di amplificazione fra i vari campioni. Il controllo endogeno in questione è la catena α del fattore di elongazione EF1 (Bini *et al.*, 2008). Una coppia di primer utile per amplificare una porzione del fattore EF1 è stata disegnata su di una sequenza selezionata dall'NCBI (Accession Number: X14449) dopo aver provveduto all'allineamento di tale sequenza con alcune tratte dallo stesso gene ma appartenenti ad diverse cultivar di pomodoro; ciò si è reso necessario a causa dell'assenza sull'omonimo sito internet di sequenze di EF1 provenienti da cultivar Moneymaker di pomodoro. Anche per quanto riguarda il disegno delle coppie di primer per l'amplificazione dei geni da saggiare si è proceduto nel medesimo modo (per i numeri di accesso e le sequenze dei primer vedi Tab. 2 e 3).

La miscela di reazione per la fase di trascrizione inversa (RT) è stata la seguente: 1X Buffer, 1 mM dNTPs (Cod. U1330, Promega), 50 μ M di primer, 50 U di M-MLV e 0,5 μ l di RNA totale.

La reazione è avvenuta in microprovette da PCR da 0,2 ml con un volume di reazione di 5 μ l. La reazione è stata fatta procedere per 1 ora a 37°C e successivamente per 5 minuti a 94°C, per disattivare l'enzima M-MLV. La reazione è stata fatta avvenire nel termociclatore "Gene Amp PCR System 2400" (Perkin Elmer). Il cDNA così ottenuto è stato sottoposto alla fase di amplificazione (PCR).

Pertanto, è stata eseguita una multiplex RT-PCR, in quanto, come anzi detto, contemporaneamente al gene 'target' è stato amplificato anche il controllo endogeno EF1. Per PR-1 è stata usata la seguente

miscela di reazione: 1X Buffer (Promega, 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer, M890A), 2 mM MgCl₂, 0,4 mM di dNTPs, 200 nM di primer del controllo endogeno e 600 nM di primer del gene ‘target’, 1 U di Taq DNA polimerasi (Promega, GoTaq Flexi DNA Polymerase, M830A) e 5 µl di cDNA per un volume finale di 25 µl. Per PR-4, PR-5 e CHT1 è stata usata invece la seguente miscela di reazione: 1X Buffer, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM di dNTPs, 200 nM di primer del controllo endogeno ed anche del gene ‘target’, 1 U di Taq DNA polimerasi e 5 µl di cDNA per un volume finale di 25 µl.

Il profilo termico della PCR utilizzato è stato il seguente: una fase di denaturazione iniziale (pre-denaturazione) a 94°C per 5 minuti, seguita da 30 cicli comprendenti una denaturazione a 94°C per 1 minuto, un appaiamento a 63°C per 30 secondi ed un’estensione a 72°C per 35 secondi; la fine dei 30 cicli è stata seguita da un’estensione finale a 72°C per 10 minuti. Tutti gli ampliconi sono stati separati, mediante elettroforesi a 95 V in gel di agarosio all’1,3%; i gel sono stati immersi in

Tabella 2: numeri di accesso dei geni bersaglio per l’amplificazione del cDNA mediante PCR.

Gene Bersaglio	Numero di accesso
EF1α1	X14449
PR1a (P4)	M69247
PR4 (P2)	X58548
PR5 (P23)	X70787
CHT1	Z15140

Tabella 3: sequenze dei primers per i saggi di amplificazione genica.

Gene bersaglio	Sequenza dei primers (5' → 3')	Lunghezza dell'amplicone
EF1 α 1	Primer Senso: AGC TGG TAT CTC CAA AGA TGG TCA GAC Primer Antisenso: TCA TCT TAA CCA TAC CAG CAT CAC CGT	805 bp
PR1a (P4)	Primer Senso: CAC TCT TGT GAG GCC CAA AAT TCA CC Primer Antisenso: TAC TTT AAT AAG GAC GTT CTC CAA CC	427 bp
PR4 (P2)	Primer Senso: TGT CAT CAA CAT GAT GAT GGC GGT GGC Primer Antisenso: ATA GCC CAA TCC ATT AGT GTC CAA TCG	349 bp
PR5 (P23)	Primer Senso: GAC TTA CAC TTA TGC TGC CAC TTT CGA G Primer Antisenso: GGT AGC TAT ACG CAT CAG GAC ATC TTT G	560 bp
CHT1	Primer Senso: CTG TGC TTT TGC TGT CTG CCT CTG C Primer Antisenso: TGG GGA TTG AGG AGT CAT CCA GAA C	664 bp

una soluzione di etidio bromuro per 30 minuti ed in seguito decolorati in acqua distillata per ca. 2 minuti ed infine osservati al transilluminatore e fotografati.

2.6.3. Estrazione della banda da gel

Una volta terminata la PCR del target desiderato, è stato caricato il gel di agarosio e si è proceduto con la corsa elettroforetica in TAE; le bande da estrarre sono state visualizzate (etidio bromuro ed UV), asportate dal gel mediante bisturi ed infine inserite all'interno di Eppendorf.

E' stato usato il kit della Promega Wizard^R Gel and PCR Clean-Up System. Ad una provetta Eppendorf è stato aggiunto un volume della soluzione "Membrane binding solution", contenuta nel kit, in ragione di 10 µl per mg di peso del gel contenente la banda da estrarre. La miscela è stata vortexata per qualche secondo e poi incubata a 65°C in un termoblocco; ad intervalli di pochi minuti, la provetta Eppendorf è stata vortexata per aumentare la velocità di scioglimento del gel. Successivamente, il contenuto della provetta è stato trasferito nella colonnina del kit (SV minicolumn) provvista del proprio tubo di raccolta da 2 ml (Collection tube); il tutto è stato fatto incubare a temperatura ambiente per 1 minuto. Il tubo è stato poi centrifugato per 1 minuto a 16000g; in questo modo, il DNA rimane legato alla membrana presente nella colonnina, mentre tutto il resto passa nel tubo di raccolta. La colonnina è stata tolta dal suo tubo di raccolta, per eliminare il contenuto di quest'ultimo, e poi vi è stata rimessa. E' stato fatto un lavaggio con la soluzione "Membrane Wash solution", fornita dal kit, aggiungendo 700 µl alla colonnina. La provetta è stata centrifugata come sopra ed è stato di nuovo eliminato il liquido di lavaggio presente nel tubo di raccolta. E' stato ripetuto il lavaggio con 500 µl di "Membrane Wash solution", seguito da una centrifugazione a 16000g per 5 minuti. Di nuovo è stato eliminato il contenuto del tubo di

raccolta e dopo aver rimesso la colonnina sul tubo, è stata ripetuta la centrifugazione per 1 minuto. La colonnina è stata trasferita su una provetta Eppendorf da 1,5 ml e sono stati aggiunti 50 µl di H₂O priva di nucleasi (fornita dal kit) direttamente nel centro della colonnina. Dopo centrifugazione di 1 min. a 16000g, è stato recuperato nella provetta l'eluato contenente la banda. Il campione è stato conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

2.6.4. Clonaggio dei prodotti PCR

2.6.4.1. Preparazione delle cellule competenti di *Escherichia coli* (ceppo JM 109)

Tale ceppo batterico (High Efficiency Competent Cells cat. L2001, Promega) è stato allevato in beute contenenti 50 ml di brodo LB (Vedi APPENDICE) a 37°C in agitatore rotativo per tutta la notte. L'incubazione delle beute è stata mantenuta fino a quando l'assorbanza della sospensione, misurata tramite spettrofotometro JENWAY, non ha raggiunto 0,25-0,30 O.D. a 650 nm; le colture sono state poi raffreddate a 0°C in ghiaccio. Mantenendo le sospensioni in ghiaccio, è stato unito il contenuto delle beute agitando bene affinché la sospensione fosse omogenea e la si è ripartita in tubi di polipropilene (falcon) da 50 ml e mantenuti in ghiaccio per 10 minuti; tutti i passaggi successivi sono stati svolti in condizioni asettiche. La sospensione è stata centrifugata per 10 minuti a 4800 rpm e a 10°C; il surnatante è stato eliminato e, mantenendo il tubo in ghiaccio, il pellet è stato risospeso delicatamente in 10 ml di CaCl₂ 0,1 M freddo (vedi APPENDICE) in circa 10 minuti. Dopo incubazione di 20 minuti in ghiaccio, le cellule sono state

recuperate tramite centrifugazione per 10 minuti a 4800 rpm a 10°C come dianzi riportato. Il surnatante è stato eliminato e, successivamente, il pellet è stato risospeso in 2 ml di CaCl_2 0,1 M per ogni 50 ml di coltura batterica originaria. Alle cellule è stato aggiunto glicerolo onde evitarne il danneggiamento durante la conservazione: a 25 ml di sospensione batterica, è stato aggiunto un volume di 5,2 ml di glicerolo 87% per avere una concentrazione finale di glicerolo pari al 15%. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state suddivise in aliquote di 1 ml in provette Eppendorf da 1,5 ml e sottoposte ad un rapido congelamento mediante immersione azoto liquido (N_2); dopo alcuni secondi di immersione, sono state estratte e conservate a -70°C.

Prima dell'uso, le cellule sono state rimosse dal congelatore e lasciate 10 minuti in ghiaccio, per farle scongelare lentamente e successivamente, sono state mescolate invertendo delicatamente le provette alcune volte.

2.6.4.2. Reazione di ligasi e trasformazione mediante kit pGEM-T Easy Vector System (Promega)

Le reazioni di ligasi e di trasformazione sono state effettuate con il plasmide pGEM-T Easy (Fig. 2), incluso nel kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) e rispettando le indicazioni della ditta fornitrice.

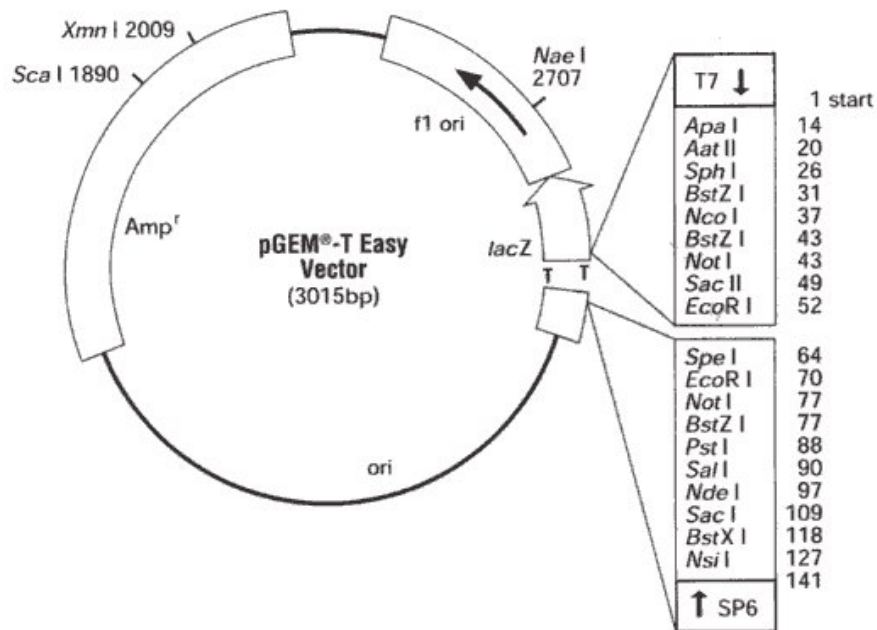


Fig. 2: rappresentazione schematica del vettore di clonaggio pGem-T Easy.

L'amplicone da clonare è stato ottenuto mediante estrazione della banda da gel con il kit della Promega "Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up System" (vedi paragrafo 2.6.3.).

La reazione di ligazione è avvenuta in un volume totale di 10 μ l costituiti da:

Buffer 2X	5 μ l
Plasmide pGEM-T	1 μ l
T4 DNA Ligasi	1 μ l
Inserto	3 μ l

La reazione è stata incubata a 4°C overnight. La reazione di trasformazione è stata effettuata aggiungendo a 3 µl di reazione di ligasi, 100 µl di cellule competenti JM109 e, successivamente, il tutto è stato raffreddato per 30 minuti in ghiaccio. Per far subire lo shock termico alle cellule competenti, necessario per l'apertura dei pori nella parete cellulare (termoporazione), i campioni sono stati mantenuti per 90 secondi a 42°C (per stimolare la sintesi proteica) e in seguito, per far richiudere i pori, rimessi in ghiaccio per 2 minuti. Sono stati addizionati 900 µl di terreno liquido SOC broth (Fluka SOC broth, cod.854699, vedi APPENDICE) per permettere alle cellule trasformate di accrescersi rapidamente, visto che questo substrato è particolarmente ricco di nutrienti; è seguita un'incubazione a 37°C per 2 ore in termostato, mantenendo i campioni in agitazione. Le cellule batteriche sono state fatte sedimentare mediante centrifugazione per 5 minuti a 14000 rpm, sono stati eliminati 400 µl del surnatante e, con una pipetta, le cellule sono state risospese nel rimanente surnatante. Questo passaggio è servito per concentrare le cellule. Per ogni campione sono state seminate 2 piastre di LB addizionato con l'antibiotico ampicillina, (100 µg/ml), IPTG (isopropil-β-D-tiogalattopyranoside; 0,5 mM), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside; 80 µg/ml): una piastra con 200 µl e l'altra con 400 µl di sospensione batterica. Le piastre sono state incubate overnight a 37°C. Il giorno dopo è stata verificata la crescita delle colonie, distinguendo quelle blu, in cui non è avvenuta la trasformazione, e quelle bianche, in cui si è verificata. Lo screening blu/bianco si basa sulla presenza del gene *lacZ* nel plasmide, codificante per l'enzima β-galattosidasi; tale enzima è in grado di degradare il substrato cromogeno X-Gal che, se integro, risulta incolore, ma se viene scisso e tagliata via la parte galattoside, dà un composto blu, il 5-bromo-4-cloro indaco. Il sito di inserzione si trova

all'interno del gene che codifica per una componente essenziale della β -galattosidasi: questo comporta che se DNA estraneo si è inserito e ha interrotto il gene, la β -galattosidasi non è più attiva e non potrà più scindere l'X-Gal che rimarrà incolore, mentre se non c'è stata nessuna inserzione, l'enzima sarà attivo e si produrrà il substrato colorato. Di conseguenza le colonie bianche sono trasformate, quelle blu no. La presenza dell'ampicillina nel substrato serve per poter selezionare solo le colonie di *E. coli* contenenti il vettore di clonaggio, che porta il gene per la resistenza a tale antibiotico (Fig. 2). L'IPTG è un induttore dell'operone *lacZ* contenente il gene per la β -galattosidasi.

Al fine di verificare che il prodotto di PCR clonato nel vettore plasmidico fosse quello desiderato, è stata eseguita una reazione di PCR di controllo sui batteri di alcune colonie bianche. Con stecchini sterili, sono state prelevate le colonie bianche trasferendole prima su una "master plate", cioè una piastra di LB in cui è stata disegnata una griglia in corrispondenza della base della piastra, e ponendo successivamente la punta dello stecchino in una Eppendorf di 0,5 ml contenente 50 μ l di acqua distillata sterile. La piastra è stata messa in termostato per alcune ore a 37°C. Le provette Eppendorf contenenti la sospensione batterica sono state vortexate e poi tenute a 100°C per 5 minuti in modo tale da rompere la membrana esterna e la membrana cellulare e favorire così la fuoriuscita del DNA plasmidico; i tubi sono stati trasferiti subito in ghiaccio e successivamente centrifugati per 1 minuto a 13000 rpm. Per la PCR di verifica sono stati utilizzati 5 μ l del surnatante contenente il DNA uniti alla miscela di reazione avente lo stesso profilo chimico delle RT-PCR eseguite per ottenere l'amplicone clonato; anche il profilo termico è il medesimo delle RT-PCR sopra menzionate.

2.6.4.3. Estrazione del plasmide ricombinante

Per l'estrazione del plasmide e la purificazione dell'inserto è stato usato il kit "Wizard Plus SV Minipreps" (Promega) seguendo il seguente protocollo.

È stato raccolto il pellet da 10 ml di coltura batterica tramite centrifugazione per 5 minuti a 10000 rpm, ed il surnatante è stato eliminato. Sono stati aggiunti 250 µl della soluzione di risospensione cellulare "Cell Resuspension Solution" Wizard Plus SV Minipreps e il pellet è stato risospeso completamente vortexando. Sono poi stati aggiunti 250 µl della soluzione di lisi cellulare Wizard Plus SV Minipreps "Cell Lysis Solution" e il tutto è stato miscelato invertendo il tubo quattro volte; è seguita un'incubazione a temperatura ambiente per 1-5 minuti, controllando il chiarificarsi della sospensione, indice di lisi della cellula batterica.

Sono stati aggiunti 10 µl di proteasi alcalina "Alkaline Pretease Solution" e la sospensione è stata agitata invertendo il tubo quattro volte; il tutto è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati aggiunti 350 µl di soluzione di neutralizzazione "Wizard^R Plus SV Neutralization Solution" e si è agitato il tubo invertendolo quattro volte. Il lisato batterico è stato centrifugato per 10 minuti a 14000 rpm e a temperatura ambiente. Un volume di 850 µl circa di lisato sono stati trasferiti con una micropipetta in una colonnina "Wizard Plus SV Minipreps spin column" inserita in un tubo di raccolta di 2 ml. E' stata fatta attenzione a non prelevare il precipitato bianco presente in fondo alla provetta. Il

campione è stato centrifugato per 1 minuto a 14000 rpm a temperatura ambiente e, successivamente, è stato eliminato il liquido defluito in fondo al tubo di raccolta, rimuovendo la colonnina; questa è stata poi riposizionata sul tubo. La colonna è stata sottoposta a lavaggio aggiungendo 750 µl di soluzione di lavaggio “Column Wash Solution”, precedentemente diluita con etanolo al 95%. Dopo centrifugazione per 1 minuto a 14000 rpm a temperatura ambiente, è stata nuovamente rimossa la colonna dal tubo di raccolta per eliminare il liquido di scarto nel tubo. La colonnina è stata riposizionata sul tubo. E’ stato ripetuto il lavaggio aggiungendo 250 µl di soluzione di lavaggio “Column Wash Solution”, di nuovo centrifugato per 2 minuti a 14000 rpm a temperatura ambiente. La “Wizard Plus SV Minipreps spin column” è stata trasferita in un tubo Eppendorf pulito e sterile e il DNA plasmidico è stato eluito aggiungendo 100 µl di acqua priva di nucleasi “Nuclease-Free Water” alla “Wizard Plus SV Minipreps spin column”. Si è centrifugato per 1 minuto a 14000 rpm a temperatura ambiente. Infine, la colonnina è stata rimossa dal tubo ed eliminata; il campione così ottenuto è stato conservato a -20°C sino al momento dell’uso.

2.6.4.4. Digestione del plasmide ricombinante con *EcoRI*

Al fine di avere ulteriore conferma dell’avvenuta clonazione dell’inserto, il DNA plasmidico è stato sottoposto a digestione con l’enzima di restrizione *EcoRI*, che riconosce due siti di restrizione, uno a monte e l’altro a valle del sito di clonaggio.

E’ stata usata la seguente miscela di digestione:

Buffer 10X

1,0 µl

<i>Eco</i> RI (12 U/ μ l; Promega)	0,5 μ l
DNA plasmidico	1,0 μ l
Acqua distillata sterile	7,5 μ l

Per un volume totale di 10 μ l.

I campioni sono stati incubati in termostato per tre ore a 37°C (o anche overnight). I prodotti di digestione sono stati esaminati dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio allo 0,8%.

2.6.4.5. Sequenziamento dell'amplicone clonato

Sono stati prelevati 1,5 μ g di DNA plasmidico estratto precedentemente, sono stati essiccati in campana da vuoto ed infine sono stati sequenziati (MWG, DNA sequencing); le sequenze sono infine state confrontate ed allineate con le sequenze utilizzate per il disegno dei primer usati nelle RT-PCR in multiplex. Le sequenze estrapolate sono infine state usate per la progettazione di primer utili per la Real Time RT-PCR.

2.6.4.6. Disegno primer per Real Time PCR e loro messa a punto

Per il disegno di primer utili nella successiva Real Time PCR è stato usato il programma Primer Express 2.0 utilizzando come poc'anzi detto le sequenze ottenute in precedenza (*Tabella 4*). Una volta ottenuti i primer si è proceduto alla messa a punto di questi, in modo da

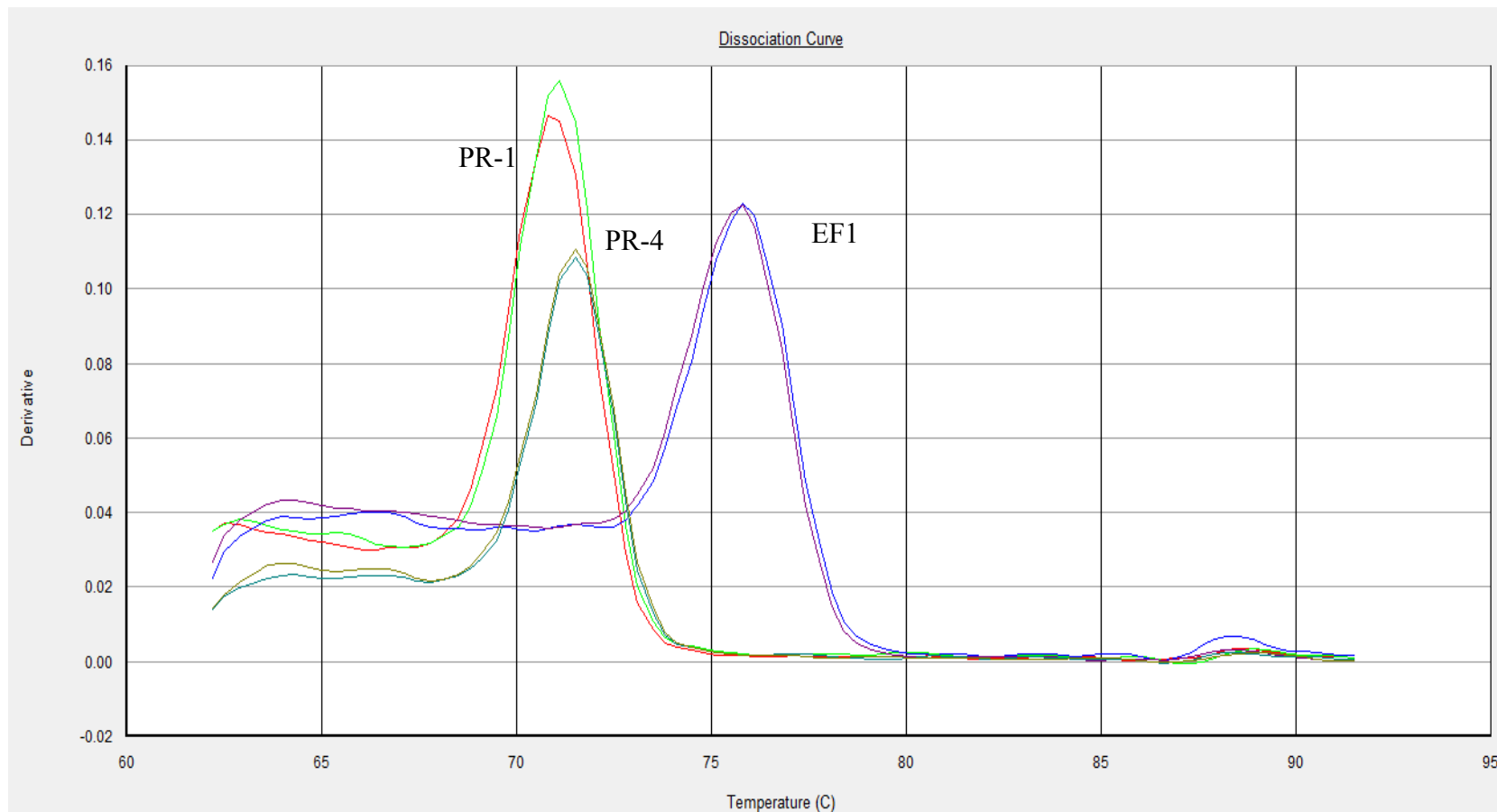


Figura 2 bis: curve di dissociazione indicanti la specificità degli ampliconi ottenuti mediante Real Time RT-PCR degli mRNA codificanti per EF1 (controllo endogeno; ca. 76°C), PR-1 e PR-4 (ca. 72°C).

garantirne un'efficienza ottimale per ogni coppia prima di cominciare con la quantificazione relativa (*Fig. 2 bis*).

2.6.4.7. Real Time PCR

Per questo tipo di saggio eseguito con chimica SYBR Green/ROX (Kit SYBR Green PCR Core Reagents, cod. 4304886) si è scelto di eseguire trascrizione inversa e PCR sul retrotrascritto in un solo passaggio (“One Step”) aggiungendo la trascrittasi inversa (M-MLV) direttamente alla miscela di reazione. Inoltre, non è stato più necessario eseguire delle PCR in multiplex bensì sono state adoperate singolarmente le coppie di primer. Sono stati analizzati solo i campioni del secondo esperimento e dei rilievi fatti fino a 48 ore ed in particolare è stata analizzata l'espressione dei geni delle PR-1 e PR-4 (oltre che del controllo endogeno).

Per il confronto fra le espressioni dei geni è stata usato il metodo della quantificazione relativa. Sono state fatte Real Time PCR usando diverse diluizioni dei campioni più rappresentativi (uno per ogni gene da saggiare); dei risultati ottenuti sono state fatte rette di calibrazione e le equazioni rappresentanti tali rette sono state usate come riferimento per gli amplificati di ogni campione e di ogni gene (controllo endogeno EF1 e le due PR). I risultati ottenuti dall'amplificazione degli *mRNA* retrotrascritti dei geni codificanti la PR-1 e la PR-4 sono stati normalizzati ai risultati di amplificazione degli *mRNA* del controllo endogeno EF1. Tale rapporto è stato considerato indice di aumento o riduzione dell'espressione dei due geni considerati. I dati sono stati

elaborati statisticamente con ANOVA test (Duncan, p 0,05) (Ratti *et al.*, 2004).

Per quanto concerne il profilo chimico della PCR riguardante il controllo endogeno EF1 α 1, la PR-1° e la PR-4 è stata adottata la seguente miscela di reazione: 1X Buffer, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM di dNTPs, 400 nM di primer, 1 U di Taq DNA polimerasi (AmpliTaq Gold DNA Polymerase), 2 U di M-MLV e 1 μ l di RNA per un volume finale di 25 μ l.

Il profilo termico è stato: 48°C per 30 minuti (trascrizione inversa), 95°C per 10 minuti (per l'attivazione della Taq), e, 95°C per 15 secondi (denaturazione) e 60°C per 1 minuto (appaiamento ed estensione; fase di lettura) ripetuti per 40 cicli. Per verificare la specificità dei primer sono state fatte le curve di dissociazione degli ampliconi di tutti i campioni; l'analisi delle curve di dissociazione è stata ottenuta mediante il seguente profilo termico: 95°C per 15 secondi, 60°C per 20 secondi ed infine 95°C per 15 secondi.

Tabella 4: sequenze dei primers per i saggi di Real Time RT-PCR.

Gene bersaglio	Sequenza dei primers (5' → 3')	Temperatura di dissociazione dell'amplicone
EF1 α 1	Primer Senso: CTG TAG AGA TGC ACC ACG AAG C Primer Antisenso: CAT TGT CAC CAG GGA GTG CC	83°C
PR1a (P4)	Primer Senso: TGT TGG TGG AAA AAT GTG TGG A Primer Antisenso: GAG TTG CGC CAG ACT ACT TGA GT	77°C
PR4 (P2)	Primer Senso: TAT GAA CGT TAG GGC AAC GTA TCA Primer Antisenso: CAG TTT ATG TTT TGC GGA TTG TAC A	75°C
PR5 (P23)	Primer Senso: CCA GTT TAG CAA CCT AGA TTT CTG G Primer Antisenso: TTA AAT CCA TCG ACT AAA GAA ATG TCC	75°C

3. RISULTATI

È stata analizzata l'espressione genica in pomodoro dopo trattamento con Bion elicitore di risposte di difesa nelle piante già noto e facente funzioni di controllo positivo e con il ceppo batterico antagonista IPV-BO G19. Sono stati scelti alcuni geni considerati marcatori di resistenza sistemica acquisita (SAR) ed è stata saggiata la loro espressione temporale dopo il trattamento con il batterio. I geni si riferivano a varie proteine da patogenesi identificate in pomodoro: PR-1, PR-4, PR-5 e chitinasi basica intracellulare (CHT1). L'RNA utilizzato per le analisi molecolari è stato estratto da materiale fogliare

raccolto agli intervalli 0, 24, 48 ore e 6 giorni dopo il trattamento nel primo esperimento, mentre a 0, 24, 48, 72 e 96 ore dopo il trattamento nel secondo esperimento (*Fig. 3*).

Per lo studio dell'espressione temporale di questi geni sono state usate la RT-PCR semi-quantitativa e la Real Time RT-PCR con chimica SYBR Green.

La tecnica della RT-PCR, in entrambi i casi, ha permesso di amplificare gli RNA messaggeri (*mRNA*) relativi alle PRs sopra riportate e ha messo in evidenza precise differenze temporali di espressione, quantificabili attraverso la valutazione di intensità delle bande ottenute dopo amplificazione e colorazione del gel in bromuro di etidio nel primo caso ed attraverso l'analisi dei dati estrapolati a reazione avvenuta nel secondo.

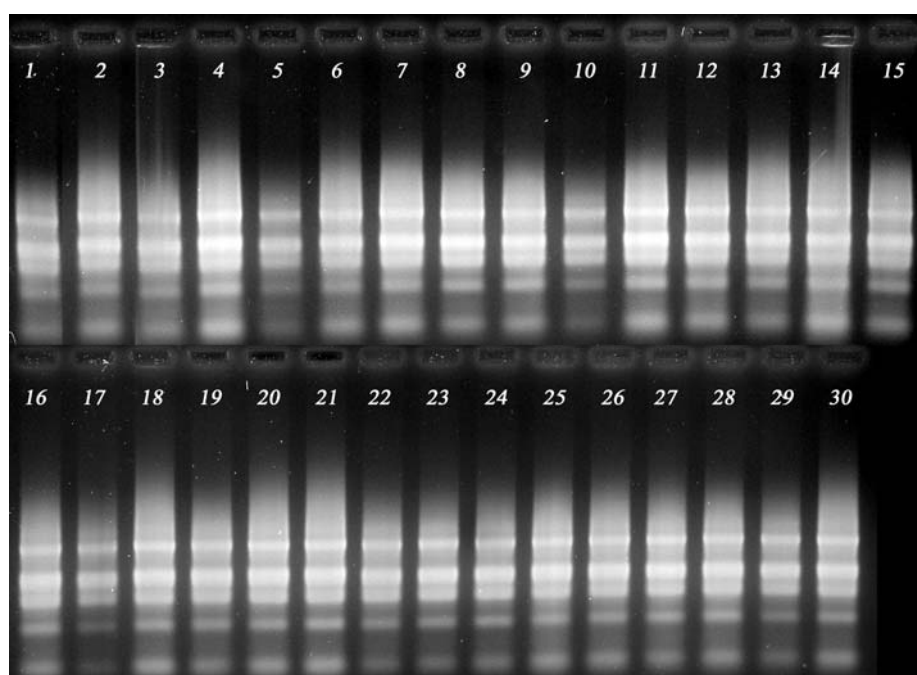


Fig.3: RNA totale di pomodoro separato in gel di agarosio al 1,2%. Sono riportati gli intervalli di prelievo di ciascun campione 0, 24, 48, 72, 96 ore di tutte le tesi trattate (Bion 1-5; WS 6-10; WR 11-15; G19 T 16-20; G19 Tm 21-25; G19 A 26-30).

3.1. Saggio su espressione genica mediante RT-PCR dopo il trattamento con IPV-BO G19

1° ESPERIMENTO

Nel caso in cui è stata fatta questa prima analisi di espressione genica dopo applicazione dell'ceppo antagonista IPV-BO G19, l'analisi con RT-PCR ha permesso di rilevare un progressivo aumento dell'espressione della PR-1, considerata marcatore di SAR (Hamiduzzaman *et al.*, 2005), anche se è stato possibile rilevarlo solo fino a 48 ore dall'applicazione del batterio antagonista (*Fig. 4 D*); è stato possibile altresì rilevare un incremento in apparenza significativo dell'espressione della PR-4, dal tempo 0 ore al tempo 6 giorni (*Fig. 4 D*). Per quanto riguarda l'espressione della PR-5 non sono state notate differenze con i testimoni trattati con acqua. Differente situazione ci è presentata dalla presenza apparentemente costitutiva della CHT1 in tutte le tesi trattate (*Fig. 4 A, B, C e D*), compresi i testimoni trattati con acqua, da 0 ore a 6 giorni dal trattamento. I controlli positivi trattati con Bion hanno fornito i dati attesi mostrando un generale aumento di tutte le PR saggiate (*Fig. 4 C*). Nei controlli negativi (trattati con acqua) è stato rilevato un leggero aumento dell'espressione di PR-1 e PR-4 tra 0 ore e 6 giorni (*Fig. 4 A e B*).

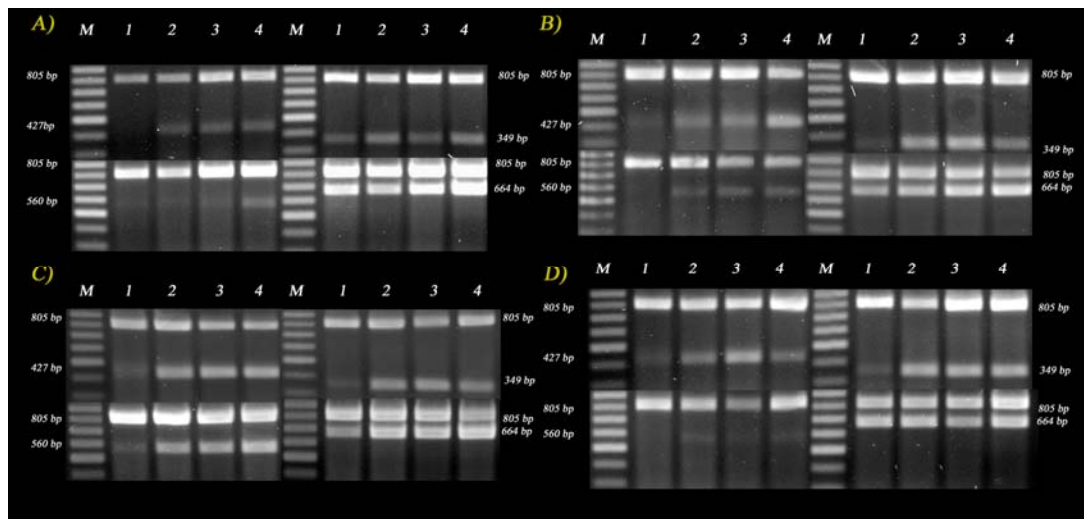


Fig. 4: A) Controllo negativo WR; B) Controllo negativo WS; C) Controllo positivo Bion; D) IPV-BO G19. M = Marker 100 bp (Promega); 1 = 0 ore; 2 = 24 ore; 3 = 48 ore; 4 = 6 giorni.

2° ESPERIMENTO

In questo secondo tentativo, le piante costituenti il controllo negativo WR ha mostrato un discreto aumento dell'espressione della PR-4 ai rilievi 24, 48, 72 e 96 ore (*Fig. 5 A e 5 B*); per quanto riguarda il controllo negativo WS si è potuto notare un leggero incremento degli mRNA codificanti la PR-4. Situazione analoga al controllo WR è risultata evidente, soprattutto se messa a confronto con i controlli endogeni e con i due controlli negativi, nei pomodori trattati con cellule morte di IPV-BO G19 (*Fig. 5 E*). Per quanto concerne gli individui trattati sempre mediante taglio radicale ma con cellule vive di IPV-BO G19, l'aumento è risultato evidente fino a 96 ore (*Fig. 5 D*), così come nei controlli trattati con Bion (*Fig. 5 C*); molto simili sono stati i risultati dei trattati con cellule vive ma semplicemente irrigate (G19 A). In questo caso però l'aumento si è potuto notare solo fino a 72 ore (*Fig.*

5 F). Per la PR-1, nel controllo WR, si è potuto notare, un aumento dell'espressione da 48 fino a 96 ore (*Fig. 5A*); nel caso del controllo WS, è risultato evidente un lieve aumento solo dopo 96 ore (*Fig. 5B*). Così è stato anche per i pomodori trattati con IPV-BO G19 morto (G19 Tm) e per quelli della tesi G19 A (ad eccezione di un lieve aumento a 72 ore dall'applicazione) ((*Fig. 5E ed F*). È risultato evidente l'aumento avutosi nelle piante trattate con IPV-BO G19 vivo e trattato con bagno radicale (G19 T) anche se solo fino a 72 ore dal trattamento (*Fig. 5 D*); un notevole aumento dell'espressione genica è stato altresì notato nei pomodori trattati con Bion (controllo positivo) fino a 96 ore dall'applicazione (*Fig. 5 C*).

L'analisi dell'espressione del gene della PR-5 ha confermato i risultati del primo esperimento; infatti non sono stati contemplati incrementi evidenti in nessuno dei campioni salvo qualche casuale eccezione.

Anche l'analisi dell'espressione del gene della CHT1 ha confermato i dati del primo esperimento risultando essere trascritto apparentemente in modo costitutivo.

3.2. Sequenziamento dell'amplicone clonato ed allineamento con sequenze note

Il sequenziamento dei frammenti amplificati mediante RT-PCR e utilizzati nella progettazione di primer per la Real Time RT-PCR, ha confermato un alto livello di omologia con le sequenze reperite sul sito NCBI; le sequenze di tali ampliconi sono state analizzate tramite i programmi di analisi bioinformatica ApE (*Fig. 6, 7 e 8*), MegAlign ed

il server BLAST del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). I dati di sequenza di PR-1, PR-4 e PR-5 hanno mostrato un'omologia rispettivamente del 99, 99 e 99% rispetto a alle sequenze reperite su NCBI (numeri di accesso M69247, X58548, X70787); mentre i dati di sequenza relativi al controllo endogeno EF1 α 1 hanno evidenziato un'alta omologia (96%) (*Fig. 5*) (numero di accesso: X14449).

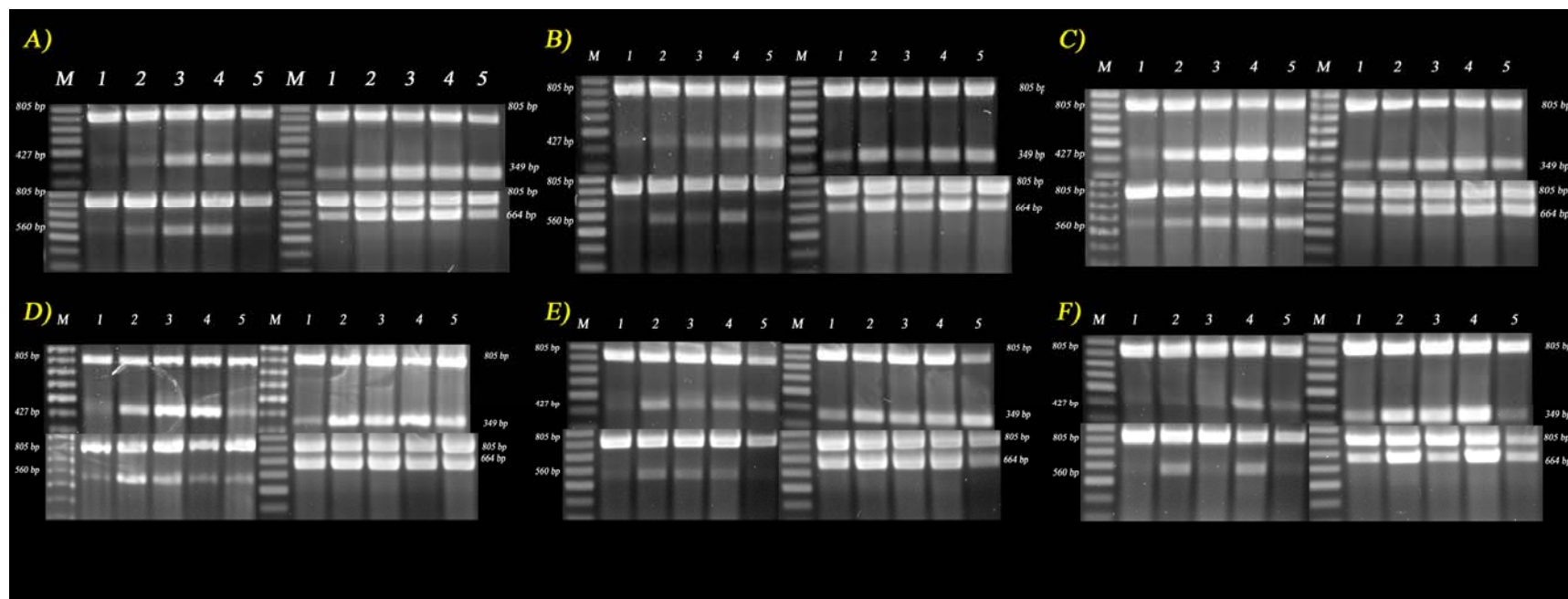


Figura 5: A) Controllo negativo WR; B) Controllo negativo WS; C) Controllo positivo Bion; D) IPV-BO G19 T; E) IPV-BO G19 Tm; F) IPV-BO G19 A. M = Marker 100 bp (Promega); 1 = 0 ore; 2 = 24 ore; 3 = 48 ore; 4 = 72 ore; 5 = 96 ore.


```

      *      *      *      *      *      *      *      *
1  gggagacggcagtgattgtat--acga-ctcactatagggcgaattgggc-cgcac--gtcgcgatgctcccggccgcca-tggcggccgcgga-attcg 92
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
1  ~aaaatgg--g-g-ttgt-tcaac-atctca-t-t-g-----tt-actc-acttgtctcatg-----g-----tattagc--c-----atat-- 58
      *      *      *      *      *      *      *      *

93  attcactcttgtgaggcccaaaattcaccccaagactatcttgcggttcacaacgatgcccggtgcccaagtcggagtcgggccaatgtcttgggatgcc 192
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
59  -ttcactcttgtgaggcccaaaattcaccccaagactatcttgcggttcacaacgatgcccggtgcccaagtcggagtcgggccaatgtcttgggatgcc 157
      *      *      *      *      *      *      *      *

193  acttggcatcccagcagcaaaaactatgccaaactcaagagcgggtgattgtaatttgattcattctggtgctggggagaaccttgccaagggtggtggtga 292
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
158  acttggcatcccagcagcagcaaaaactatgccaaactcaagagcgggtgattgtaatttgattcattctggtgctggggagaaccttgccaagggtggtggtga 257
      *      *      *      *      *      *      *      *

293  cttcacggggaggcagcagcgtgcaattgtgggtgtccgagaggccagactataactacgctaccaaccaatgtgttggtggaaaaatgtgtggacattat 392
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
258  cttcacggggaggcagcagcgtgcaattgtgggtgtccgagaggccagactataactacgctaccaaccaatgtgttggtggaaaaatgtgtggacattat 357
      *      *      *      *      *      *      *      *

393  actcaagtagtctggcgcaactcagtcagtaggttgtgggtcggttcggttgcacaatgggtggtggttcatttcttgcaactacgactcctgtaggca 492
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
358  actcaagtagtctggcgcaactcagtcagtaggttgtgggtcggttcggttgcacaatgggtggtggttcatttcttgcaactacgactcctgtaggca 457
      *      *      *      *      *      *      *      *

493  actgggttgaggagaacgtccttattaaagtaaacactagtaggaattcgccggccgctgcaggtcgaccatattgggagagctcccaacgcgttgtaggata 592
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
458  actgggttgaggagaacgtccttattaaagta-----ca-----ga-----g-gg-g-----a-----a-----c-c----- 487
      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Fig. 6: analisi mediante programma ApE: sequenza superiore = sequenza PR-1 sequenziata da cv. Moneymaker; sequenza inferiore = sequenza PR-1 reperita su NCBI (Accession Number: M69247).

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
1  gtggagacgtcagtgattgtatcagactcactatagggcgaattggggcccgacgtcgcgatgctcccggccgccaatggcggccgcggaattcgattgtc 100
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
1  atggaga-g--agt-----ta-ac-a-----ag-----tt-----gt-g--tg-t-----a--gc-----att-tttgtc 39
      *      *      *      *      *      *      *      *

101  atcaacatgatgatggcggtggccgcagcgcgcaaaagcgtatgaacgttagggcaacgtatcatttgtacaatccgcaaaacataaaactgggatttaagaa 200
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
40  atcaacatgatgatggcggtggccgcagcgcgcaaaagcgtacgaacgttagggcaacgtatcatttgtacaatccgcaaaacataaaactgggatttaagaa 139
      *      *      *      *      *      *      *      *

201  ctgctagcgtttactgcgctacctgggatgctgacaagcctctggagtgccgcggaggtatggctggaccgctttttgcggtccagctggacctaagg 300
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
140  ctgctagcgtttactgcgctacctgggatgctgacaagcctctggagtgccgcggaggtatggctggaccgctttttgcggtccagctggacctaagg 239
      *      *      *      *      *      *      *      *

301  ccaagcttcagtcggtatagcttggaggtgaccaacacaggaacaggaacacagaacagtgagaatagtagatcaatgcagaaatggagggttgat 400
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
240  ccaagcttcagtcggtatagcttggaggtgaccaacacaggaacaggaacacagaacagtgagaatagtagatcaatgcagaaatggagggttgat 339
      *      *      *      *      *      *      *      *

401  ttggatgtaaacggttttcaacagattggacactaatggattgggtatatacactagtgaattcggcgccgctgcaggtcgaccatattgggagagctcc 500
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
340  ttggatgtaaacggttttcaacagattggacactaatggattgggtat-----ca-----ga-----g-gg-g-----a-----a-----c-c----- 400
      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Fig. 7: analisi mediante programma ApE: sequenza superiore = sequenza PR-4 sequenziata da cv. Moneymaker; sequenza inferiore = sequenza PR-4 reperita su NCBI (Accession Number: X58548)

24 ore, per poi tornare nella norma a 48 ore. Nessun incremento invece è stato mostrato da parte delle tesi trattate con G19 A e con acqua (WS). Il secondo controllo con acqua (WR) invece ha mostrato incremento di trascrizione fino a 48 ore, perdendo così di significatività nei confronti delle tesi trattate con la medesima metodologia (*Fig. 9*).

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione della PR-4, l'andamento del grafico per le tesi WS, WR e G19 Tm (*Fig. 10*) rispecchia, in modo però più accentuato, quello dell'analisi dell'espressione della PR-1. Nei pomodori trattati con G19 T si è invece notato un aumento progressivo della quantità di *mRNA* fino a 48 ore. Da notare l'aumento significativo di espressione della PR-4 nella tesi trattata con G19 A rispetto al controllo WS. Le tesi trattate con Bion hanno mostrato l'atteso aumento di espressione del gene della PR-4 (*Fig. 10*).

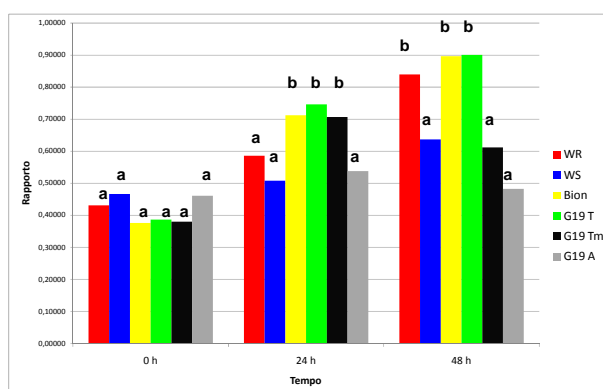


Figura 9: analisi quantitativa dell'espressione del gene della PR-1.

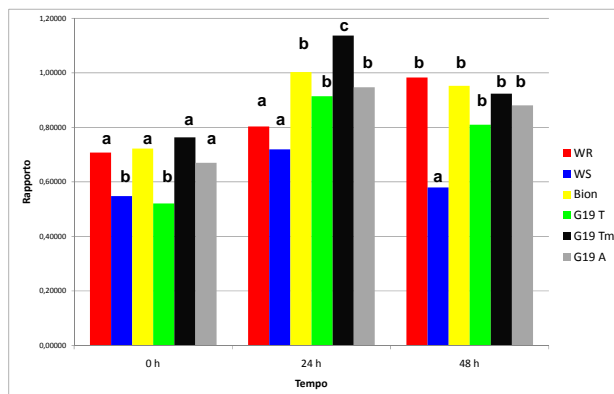


Figura 10: analisi quantitativa dell'espressione del gene della PR-4.

4. DISCUSSIONE

I risultati delle quantificazioni relative eseguite con la Real Time PCR (*Fig. 9 e 10*) sui campioni del 2° esperimento, hanno confermato numericamente e statisticamente ciò che era risultato chiaro solo in apparenza nei saggi RT-PCR in multiplex (*Fig. 5*). Nel caso della PR-1, i dati ottenuti dai pomodori trattati con acqua mediante bagno radicale (WR), non si sono discostati statisticamente da quelli pomodori trattati con acqua mediante aspersione fino a 24 ore; a 48 ore, però, i due trattamenti non erano più confrontabili: infatti i pomodori trattati con WR si sono avvicinati statisticamente alle piante trattate con G19 T.

Allo stesso modo, nel caso dell'espressione del gene della PR-4, a 48 ore i trattati con WR non si sono statisticamente differenziati dai trattati con G19 T e G19 Tm. L'uso del controllo WR è stato pertanto molto importante ai fini metodologici e statistici: ci ha permesso di capire come il taglio ed il bagno radicale abbiano influenzato il saggio, grazie quindi all'analisi delle evidenze ottenute con tale controllo ed i risultati conseguiti nelle tesi trattate con la medesima metodologia (G19 T e G19 Tm). A 48 ore dall'applicazione di questi tre trattamenti non è stato più possibile discriminare il controllo negativo (WR, 'b') dalle due tesi saggiate (G19 T, 'b' e G19 Tm, 'b'): ciò è stato verificato per entrambi i geni esprimenti PR-1 e PR-4. Ciò nonostante fino a 24 ore è stato possibile notare differenze significative tra entrambi i controlli con acqua ed i trattamenti (*Fig. 9 e 10*). Quello che è stato possibile notare negli esperimenti sopradescritti è stata la risposta "immunitaria" immediata da parte delle piante trattate con G19 T e G19 Tm (Haas *et al.*, 2003) (Iavicoli *et al.*, 2003), che ha portato all'aumento della trascrizione dei geni per entrambe le PR; a 48 ore, è stato possibile notare un leggero ma significativo decremento di tale risposta (*Fig. 9 e 10*) e, osservando la *Fig. 5D ed E*, sembra che tale risposta si sia mantenuta fino a 96 ore. Mancano purtroppo i dati necessari per un'analisi statistica dei rilievi a 72 e 96 ore per confermare tale evidenza. Questi risultati significativi sono probabilmente dovuti alla presenza di componenti strutturali della cellula, come ad esempio gli LPS, presenti sulla membrana esterna della cellula batterica che, a contatto diretto con il tessuto xilematico hanno agito da induttori della risposta di resistenza. Bazzi *et al.* (2003) dopo aver trattato piantine micropropagate di pero con LPS estratti da IPV-BO G19 e da 1285d di *B. subtilis* e, dopo averle inoculate con *E. amylovora* notarono una riduzione dell'incidenza di malattia; inoltre, dopo aver pre-infiltrato

LPS in pannelli internervali di tabacco e aver inoculato 24 ore dopo *E. amylovora* nei medesimi pannelli, Bazzi *et al.* notarono assenza di HR nelle aree dove era stato inoculato il patogeno: ciò era evidenziava l'avvenuta prevenzione di HR. Nel medesimo lavoro, Bazzi *et al.* (2003) pre-trattarono piante di pomodoro, in seguito inoculate con *R. solanacearum*, nebulizzando gli LPS a livello fogliare: essi, in questo caso, non notarono alcuna riduzione nell'incidenza di malattia. L'inefficacia dei trattamenti fu imputata ad una scarsa penetrazione nelle foglie degli LPS nebulizzati.

Riguardo ai pomodori trattati con acqua aspersa (WS), Bion e G19 A (sospensione irrigata) è stato possibile notare differenze significative nell'aumento della trascrizione del gene della PR- tra WS ('a'), da un lato, e Bion ('b') e G19 A ('b') dall'altro: sembra quindi che il ceppo antagonista IPV-BO G19 applicato alle radici mediante semplice irrigazione abbia indotto resistenza causando l'aumento della trascrizione di *mRNA* del gene oggetto d'esame. Tale aumento è stato osservato anche nel campione a 72 ore analizzato con la RT-PCR in multiplex, mentre a 96 ore tale attività trascrizionale è diminuita visibilmente (*Fig. 5F*). Quando questi tre trattamenti sono stati confrontati con l'attività trascrizionale del gene della PR-1 i risultati sono apparsi molto diversi: infatti, mentre i pomodori trattati con Bion (controllo positivo) hanno dato i risultati attesi, mantenendo significativamente elevati i livelli di espressione fino a 48 ore (*Fig. 9*), le piante irrigate con G19 A non hanno incrementato la trascrizione del gene. Se poi si osserva la *Figura 5F* rappresentante i risultati delle RT-PCR in multiplex, si nota che l'aumento di attività trascrizionale genica nella tesi Bion si è protratto fino a 96 ore, differenziandosi così dalle tesi WR e G19 A. Questi risultati suggeriscono che la PR-4 possa essere coinvolta nella via di segnalazione culminante nella ISR: ciò,

anche se in disaccordo con la tradizionale interpretazione che esclude il coinvolgimento delle proteine di patogenesi nell'ISR (Hammond-Kosack *et al.*, 2003) concorda con i risultati ottenuti in precedenti lavori eseguiti su vite ed *Arabidopsis thaliana* (Hamiduzzaman *et al.* 2005; Thomma *et al.*, 2001; van Loon *et al.*, 2006). La mancanza di piante di controllo trattate con acido jasmonico non consente però di confermare la correlazione fra PR-4 ed ISR.

Le Real Time PCR per saggiare la variazione trascrizionale del gene della PR-5 non sono state eseguite, in quanto, mediante le RT-PCR semi-quantitative eseguite sulle tesi del 1° e del 2° esperimento, è risultato evidente solo un lievissimo aumento dell'espressione e sicuramente non dovuto all'applicazione dei trattamenti. Al contrario, come atteso, nella tesi Bion l'incremento è stato visivamente apprezzabile (*Fig. 4C e 5C*). L'applicazione di IPV-BO G19 quindi non incrementa i livelli di trascrizione del gene della PR-5.

Neppure per la CHT1 è stata eseguita la quantificazione relativa, dato che sia nel 1° che nel 2° esperimento (RT-PCR), la sua attività trascrizionale è sembrata costitutiva in tutti i campioni saggiati (*Fig. 4 e 5*); tuttavia questa evidenza sperimentale sembra in contrasto con ciò che è stato proposto da Danash. *et al.* (1993): essi infatti avevano notato un incremento dell'espressione di questo gene solo dopo inoculazione con *Cladosporium fulvum*. Da ciò si può supporre che le piante in esame in entrambi gli esperimenti non fossero in uno stato fisiologicamente ottimale: quest'ipotesi è suffragata dal fatto che tra i due esperimenti, sebbene i risultati siano paragonabili, vi sono state apparenti differenze nell'analisi dell'espressione dei geni della PR-1 e della PR-4 nei controlli WR: nel primo esperimento infatti l'aumento

dell'espressione di questi geni è stato apparentemente minore. Su questo punto sono in corso ulteriori approfondimenti analitici.

In conclusione, i risultati ottenuti con RT-PCR semi-quantitative e Real Time PCR mostrano come, irrigando con una sospensione (ca. 10^8 cfu/ml) di IPV-BO G19, si sia ottenuto un incremento della trascrizione del gene della PR-4 significativo fino a 48 ore ed apparente fino a 72 ore dall'applicazione.

5. BIBLIOGRAFIA

Alexander D., Goodman R. M., Gut-Rella M., Gascock C., Weyman K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E., Ryals J., 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. of Sci.* 90:7327-7331.

Bazzi C., Messina C., Tortoreto L., Bini F., Cecca G. S., Stefani E., 2003. Investigation on the possible use of abiotic and biotic elicitors in defence-related responses in plants. *Eur. J. Hort. Sci.* 68(3):115-122.

Bini F., Ragaini A., Bazzi C., 2008. Resistance responses induced by the plant growth retardant prohexadione-Ca in apple against scab infections. *Annals of Applied Biology*, 152: 19-27.

Breiteneder H., Ebner C., 2000. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. J. Aller. Clin. Immunol. 106(1):27-36.

Bustin S. A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. mol. endocr. 25:169-193.

Danhash N., Wagemakers C.A.M., van Kan J.A.L., de Wit P.J.G.M., 1993. Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. Plant Molecular Biology, 22: 1017-1029.

Dong-Dong L. I., Shao-Heng H. E., 2003. Plant allergic proteins and their biological functions. Acta Biochimica et Biophysica sinica. 35(9):789-C792.

Ferreira F., Hawranek T., Gruber P., Wopfner N., Mari A., 2004. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. Allergy 59: 243-267.

Friedrich L., Lawton K., Ruess W., Masner P., Specker N., Gut-Rella M., Meier B., Dincher S., Staub T., Uknes S., Métraux J-P., Kessmann H., Ryals J., 1996. A benzothiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. The Plant Journal 10:61-70.

Gianinazzi S., Martin C., Vallée J. C., 1970. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez la *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. C. R. Acad. Sci. Paris D. 270:2383-2386.

Ginzinger D. G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exper. Hematol.* 30:503-512.

Godard J. F., Ziadi S., Monot C., Le Corre D., Silué D., 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection* 18: 397-405.

Görlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K-H., Oostendorp M., Staub T., Wrad E., Kessmann H., Ryals J., 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.

Gosh C., Puhl I., Halbwirth H., Schlangen K., Roemmelt S., Andreotti C., Costa G., Fisher T. C., Treutter D., Stich K., Forkmann G., 2003. Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops:

flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. Eur. J. Hort. Sci. 68 (3): 144-151.

Haas D., Keel C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 117–53.

Hamiduzzaman M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J-M., Mauch-Mani B., 2005. β -Aminobutyric acid-Induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. MPMI, 18: 819-829.

Hammond-Kosack K.E., Parker J.E., 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspective for molecular resistance breeding. Current Opinion in Biotechnology, 14: 177-193.

Heil M., Hilpert A., Kaiser W., Linsenmair E., 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? J. Ecology 88:645-654.

Hoffmann-Sommergruber K., 2002. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. Biochem. Soc. transact. 30(6): 930-935.

Iavicoli A., Boutet E., Buchala A., Metraux J.-P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. MPMI 16: 851-858.

Iriti M., Faoro F., 2003. Does bensothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? J. Plant Path. 85(4, special issue): 265-270.

Maxson-Stein K, He S-Y., Hammerschmidt R., Jones A. L., 2002. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl of fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. Plant Disease 86(7):785-790.

Neuhaus J. M., Sticher L., Meins Jr. F., Boller T., 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10362-10366.

Niderman T., Genetet I., Bruyère T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Mössinger E., 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 108:17-27.

Poupard P., Parisi L., Champion C., Ziadi S., Simoneau P., 2003. A wound- and ethephon-inducible PR-10 gene subclass from apple is

differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 62:3-12.

Promega, 1996. Protocols and applications guide. III Edition. Ed. Ken Doyle. Pag. 117. Promega Corporation, USA.

Rademacher W., Kober R., 2003. Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. *Eur. J. Hort. Sci.* 68(3)101-107.

Ratti C., Budge G., Ward L., Clover G., Rubies-Autonell C., Henry C., 2004. Detection and relative quantitation of *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®). *Jour. Virol. Methods* 122: 95–103.

Roemmelt S. N., Zimmermann W., Rademacher W., Treutter D., 2003. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry*, in press.

Selitrechnikoff C. P., 2001. Antifungal Proteins. *App. Environ. Microbiol.* 67(7):2883-2894.

Soylu S., Baysal Ö., Soylu E. M., 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedling. *Plant Science* 165:1069-1075.

Sparla F., Rotino L., Valgimigli M. C., Pupillo P., Trost P., 2003. Resistenza sistemica indotta da Bion (Acibenzolar-S-metile) in pero cv. “Abate Fetel” inoculato con *Erwinia amylovora*. *Notiziario Tecnico, CRPV* 66:131-140.

Stadnik M. J., Buchenauer H., 1998. Histological and physiological changes in wheat plants by benzothiadiazole derivative. In: Lyr H., Russell P. E., Dehne H. W., Sisler H. D. (eds). *Modern fungicides and antifungal compounds*, pp. 357-366. Intercept Andover, UK.

Thomma B.P.H.J., Penninckx I.A.M.A., Broekaert W.F., Cammue B.P.A., 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 63–68.

Van Buuren M. L., Guidi L., Fornalé S., Ghetti F., Franceschetti M., Soldatini G. F., Bagni N., 2002. Ozone-response mechanisms in tobacco: implications of polyamine metabolism. *New Phytologist* 156(3):389-398.

Van Loon L. C., Van Kammen, A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* 40:199-201.

Van Loon L., Van Strien E. A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97.

Van Loon L.C., Pierpoint W. S., Boller T., Conejero V., 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:245:264.

Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J., 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 7.1–7.28

Venisse J-S., Malvoy M., Faize M., Paulin J-P., Brisset M-N., 2002. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microb. Inter.* 15(12):1204-1212.

Ziadi S., Poupard P., Brisset M-N., Paulin J-P., Simoneau P., 2001. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10

transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:33-43.

CAPITOLO V

EFFICACIA DI ELICITORI ABIOTICI E DEL CEPPO IPV-BO G19 NEI CONFRONTI DI *E. amylovora* ED INDAGINE SULLE RISPOSTE DI DIFESA DEL PERO

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, nel sistema pero-*E. amylovora*, il ceppo antagonista IPV-BO G19 è stato saggiato e messo a confronto con altri ceppi batterici antagonisti già noti ed alcuni già commercializzati come ad esempio il ceppo A506 di *P. fluorescens* (Blight Ban), il ceppo IPV-BO 3371 di *P. mendocina* nonché i biofungicidi a base di *B. subtilis* Serenade e BS-F4 (Bazzi *et al.*, 2003a; Biondi *et al.* 2006a; Biondi *et al.* 2006b; Bazzi *et al.*, 2006a; Bazzi *et al.*, 2006b; Biondi *et al.* 2007); tale ceppo è stato messo a confronto anche con composti chimici induttori di resistenza quali Regalis (prohexadione-Ca o ProCa, noto come regolatore della crescita o brachizzante), Bion (acibenzolar-S-methyl), Aliette (fosetil-Al) ecc (Bazzi *et al.* 2003b; Bazzi *et al.* 2004). Il problema fondamentale da risolvere quando si usano ceppi batterici antagonisti è quello di assicurare loro buona sopravvivenza a livello fogliare, protezione dai vari fattori ambientali e dal dilavamento. Lo scopo si persegue associando alle loro popolazioni molecole biocompatibili con la funzione adesivante e/o protettiva. Una di queste molecole è l'alginato di sodio (Ozaktan *et al.* 2004). Gli alginati definiti idrocolloidi (idrocolloide = biopolimero idrosolubile di natura colloidale quando idratato) sono eteropolimeri estratti da alghe marroni

(‘Brown Seaweed’) principalmente costituiti da sali degli acidi mannuronico e guluronico (*Fig. 1*) aventi tra loro legami intermolecolari.

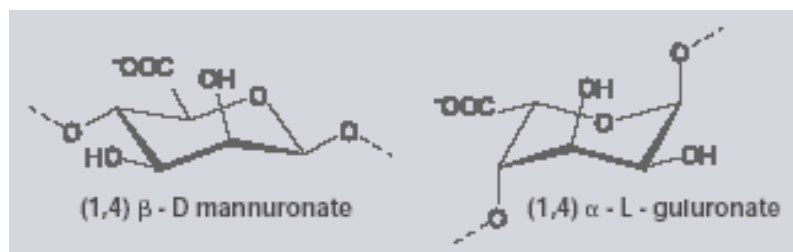


Figura 1: unità monomeriche costituenti l’alginato di sodio.

Questo polimero è anche definito fluido non-Newtoniano per la sua proprietà, denominata pseudoplasticità, contraddistinta da un aumento di viscosità nel tempo quando mescolato ad acqua distillata. Dato che i valori di pKa rispettivamente degli acidi guluronico e mannuronico sono rispettivamente di 3,65 e 3,38, l’alginato è in grado di gelificare in ambiente acido. Un’altra caratteristica importante di questo biopolimero, applicato in diversi campi inclusa la conservazione degli alimenti dove è noto come E401, è quella di costituire un substrato di crescita meno apprezzato dalla flora microbica, rispetto ad altri glucidi complessi.

Un altro aspetto importante da considerare in lotta biologica è quello di distinguere fra inibizione diretta del patogeno dovuta al ceppo antagonista e la risposta mediata dall’ospite causata dalla presenza di molecole liberate dal microrganismo antagonista od esposte alla superficie delle sue cellule morte (Zeller *et al.*, 2006).

In questo capitolo sono presentati i risultati biennali di prove di lotta contro *E. amylovora* confrontando gli effetti di trattamenti con la pseudomonade antagonista IPV-BO G19 con quelli di altri biopreparati ed elicitori abiotici.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Approntamento del biopreparato a base di IPV-BO G19

Il ceppo IPV-BO G19 è stato fatto crescere per 24 ore a 27°C su KB agar (vedi APPENDICE); le colture batteriche sono state raccolte e liofilizzate (in latte magro). Successivamente sono state valutate le concentrazioni (cfu/ml) per mg di liofilizzato in modo da conoscere preventivamente la dose applicata (ca. 10^7 cfu/ml). Per l'uso sono state calcolate ponderalmente le proporzioni appropriate da miscelare con alginato di sodio (0,5%) con aggiunta di 3-4 ml/L di glicerolo per facilitarne la dispersione e quindi lo scioglimento a temperatura ambiente.

2.2. Esperimenti in serra: sopravvivenza sulle foglie di IPV-BO G19

Sono stati intrapresi esperimenti di sopravvivenza fogliare da parte del ceppo antagonista IPV-BO G19 (Biondi *et al.*, 2006), aggiungendo alla sospensione batterica da applicare alle foglie, alginato di sodio avente funzioni di adesivante e protettore dei microrganismi benefici.

Sono state in seguito messe a confronto le dinamiche di popolazione fogliare con e senza aggiunta di alginato di sodio.

2.2.1. Materiale vegetale usato, trattamenti e rilievi

Astoni ‘Abate Fetél’ di un anno disposti in blocchi randomizzati (1 astone X 3 repliche/tesi) sono stati aspersi con sospensioni nebulizzate del ceppo rifampicina resistente IPV-BO G19 rif^r (ca. 10^6 cfu/ml) precedentemente liofilizzato; alle sospensioni è stato aggiunto 0,5% di alginato di sodio (Na-alg). Dopo 1, 24, 48, 96 ore, 7 e 13 giorni dall’applicazione fogliare sono stati fatti i rilievi: 20 foglie per tesi sono state staccate, lavate in $MgSO_4$ 10mM per 45 minuti a 200 rpm in agitatore rotativo. Il liquido di lavaggio è stato filtrato con garza sterile e centrifugato per 15 minuti a 10000g, il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 ml di $MgSO_4$ 10mM ed usato per le diluizioni decimali; 10 μ l delle diluizioni ottenute sono state deposte su KB-agar con antibiotico (rifampicina 20 μ g/ml) (vedi APPENDICE) (Biondi *et al.*, 2006). Il giorno seguente sono state contate le colonie batteriche.

2.3. Esperimenti in campo

2.3.1. Materiale vegetale, trattamenti, inoculazione e rilievi

ESPERIMENTO PRIMAVERA/ESTATE 2005

Astoni ‘Abate Fetél’ di un anno, disposti in blocchi randomizzati (5 piante X 4 repliche/tesi) (*Fig. 2A*) sono stati aspersi con una

sospensione nebulizzata (ca. 10^7 cfu/ml) del ceppo batterico antagonista IPV-BO G19 liofilizzato, con aggiunta di alginato di sodio 0,5%; sospensioni con e senza alginato di sodio sono state poi applicate sulle foglie 24 ore prima dell'inoculazione sperimentale. I due biofungicidi a base di *Bacillus subtilis* BS-F4 e Serenade (rispettivamente 1,5 g/L e 3 g/L), allo scopo di confrontare il ceppo sperimentale con altri già in commercio, sono stati applicati nello stesso modo. Dopo 24 ore, le prime tre foglie apicali di 6 germogli in attiva crescita sono state ferite (3 ferite per foglia) con apposita pinza (Galasso *et al.*, 2002) e subito dopo asperse con una sospensione (ca. 10^7 cfu/ml) del ceppo virulento di *Erwinia amylovora* OMP-BO 1077.7/94. I due biofungicidi sono stati applicati anche 24 ore dopo l'inoculazione. Il già noto bioregolatore Regalis recentemente studiato (Bazzi *et al.* 2003; Bazzi *et al.* 2004; Bazzi *et al.* 2006) come induttore di resistenza è stato applicato, alla concentrazione di 100 ppm (p.a.), in tre trattamenti a intervallo di sette giorni ad iniziare da tre settimane prima dell'inoculazione. Acqua e streptomicina sono stati usati come controlli rispettivamente positivo e negativo (Biondi *et al.*, 2006). Il rilievo è stato fatto 27 giorni dall'inoculazione con il patogeno ed i dati di incidenza relativa (germogli colpiti) e gravità (lunghezza necrosi/lunghezza germoglio) della malattia sono stati elaborati mediante saggi ANOVA (Tukey HSD e Duncan $p < 0,05$). Il patogeno è stato reisolato su NSA ed identificato mediante saggio PCR (Bereswill *et al.*, 1992).

ESPERIMENTO PRIMAVERA/ESTATE 2006

È stato ripetuto l'esperimento del 2005 con qualche variazione (*Fig. 2B*). La sospensione di IPV-BO G19 con l'aggiunta di 0,5% di alginato

di sodio è stata applicata 24 ore, 7 e 14 giorni prima dell'inoculazione; sono stati usati nei trattamenti il biofungicida Serenade applicato a due concentrazioni (250 e 350 g/L) e un composto oleoso a base di estratto di timo (0,1%) 5 e 1 giorno prima ed 1 giorno dopo l'inoculazione con il patogeno (Zeller *et al.* 2006a; Zeller *et al.* 2006b). Come ulteriore controllo positivo è stata usata la sospensione di alginato di sodio allo 0,5% senza batteri. Il rilievo è stato fatto 21 giorni dall'inoculazione ed i dati ottenuti sono stati elaborati mediante saggi ANOVA (Tukey HSD, $p < 0,05$). Il patogeno è stato reisolato su NSA ed identificato mediante saggio PCR (Bereswill *et al.*, 1992).



Figura 2: astoni di pero 'Abate Fetél' usati negli esperimenti in campo: A) nel 2005; B) nel 2006.

2.4. Esperimenti in serra: valutazione dell'espressione di CAT, SOD e POD

2.4.1. Materiale vegetale, trattamenti e raccolta campioni

Astoni 'Abate Fetél' di un anno (2 piante X 3 repliche/tesi, blocchi randomizzati) sono stati aspersi sulle foglie con sospensioni del ceppo antagonista IPV-BO G19 (ca. 10^8 cfu/ml) e del biofungicida a base di *B. subtilis* (1,5 g/L); acqua deionizzata sterile è stata usata come controllo negativo. Successivamente sono stati eseguiti campionamenti a 0, 24, 48, 72 ore e 6 giorni dal trattamento, prelevando 200 mg di tessuto fogliare (prime foglie apicali) immediatamente congelato in azoto liquido ed in seguito conservato in supercongelatore a -80°C.

2.4.2. Estrazione enzimatica

Le foglie congelate sono state pesate (ca. 200 mg) e finemente polverizzate in azoto liquido mediante mortaio e pestello precedentemente raffreddati; la polvere è stata immediatamente usata per l'estrazione delle proteine solubili totali depositandola in tubi contenenti 5 ml di tampone d'estrazione (NaKPi 100 Mm, 0,1% polivinilpolipirrolidone (PVPP) pH 7) preparato il giorno prima e conservato a 4°C; il campione è stato agitato per inversione, messo in ghiaccio per 30 minuti ed agitato di tanto in tanto. Successivamente il campione è stato centrifugato a 10000g per 30 minuti a 4°C; 2 ml del surnatante sono stati aggiunti a 2 ml di TCA al 20 % e conservati a 4°C

fino al momento della quantificazione proteica mediante saggio Bradford (Bradford, 1976) mentre 2,5 ml di surnatante residuo sono stati depositi in colonnine SephadexTM G-25M. L'eluato è stato raccolto ed usato per i saggi enzimatici (Sofo *et al.*, 2004).

2.4.3. Saggio per attività catalasica (CAT)

Per valutare l'attività catalasica, 200 µl di estratto enzimatico sono stati aggiunti a 600 µl di tampone per le catalasi (vedi APPENDICE); poco prima delle letture spettrofotometriche sono stati aggiunti 200 µl di H₂O₂ (Peridral), il tutto è stato mescolato per inversione e rapidamente inserito nello spettrofotometro. Campioni senza H₂O₂ sono stati usati come controlli negativi. La scomposizione di H₂O₂ in H₂O ed O₂ è stata seguita allo spettrofotometro misurando il decrescere dell'assorbanza a 240 nm (U.V.); sono state fatte letture ogni 20 secondi fino a 2 minuti (Aebi, 1984; Sofo *et al.*, 2004); Un'unità di attività catalasica corrisponde alla quantità di enzima necessaria per decomporre 1 µmol di H₂O₂ in un minuto (Havir and McHale, 1987)

2.4.4. Saggio per attività perossidasi (POD)

L'attività perossidasi è stata misurata aggiungendo ad ogni provetta (comprese quelle dei controlli negativi) 2,9 ml di NaKP_i 10 mM pH 7,0, in seguito sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione di guaiacolo 10 mM; le provette sono state agitate per inversione, sono stati aggiunti 40 µl di estratto enzimatico ed il tutto è stato agitato per

inversione. Per far partire la reazione sono stati aggiunti 10 µl di H₂O₂ 40 mM (la miscela è il tampone per le perossidasi, vedi APPENDICE); i campioni sono stati lasciati riposare da 10 fino a 30 minuti (a differenza della velocità della reazione) a 25°C. Allo scadere dei 10/30 minuti sono iniziate le letture allo spettrofotometro a 470 nm (visibile) (Chance and Maehly, 1955; Sofo *et al.* 2004).

2.4.5. Saggio per superossidodismutasi (SOD)

Per saggiare l'attività della superossidodismutasi sono stati preparati 8 tubi (2 dei quali per i controlli negativi) entro cui sono stati depositati 2 ml di tampone NaKPi 65 µM (pH 7,8); ai due tubi costituenti i controlli negativi sono stati aggiunti 650 µl (Bl) e 550 µl (Bk). Nei rimanenti 6 tubi sono stati messi 540, 530, 510, 490, 470 e 50 µl del medesimo tampone. Successivamente, a tutte le provette sono stati aggiunti 100 µl di metionina (per stabilizzare la SOD), 200 µl di EDTA/KCN (per disattivare tutti gli altri enzimi) ed infine, in tutti i tubi tranne che nel controllo BL, sono stati aggiunti 100 µl di nitroblu di tetrazolio (NBT); le provette sono poi state agitate in vortex. Nei tubi sono poi stati caricati 10, 20, 40, 60, 80 e 500 µl di estratto enzimatico e poi, in penombra, sono stati depositi in ogni tubo 50 µl di riboflavina (120 µM); le provette sono state agitate in vortex e, per avviare la reazione, sono state esposte alla luce di 4 lampade fluorescenti (Leuci, 15 WTS preheat, daylight 6500°K) per 30 minuti. Dopo tale periodo è stato notato un viraggio dei campioni al viola, segno evidente dell'ossidazione dell'NBT a formazano; tale viraggio è stato di diversa

intensità a differenza della diluizione del campione. Le letture spettrofotometriche sono state fatte a 560 nm.

Il volume di estratto enzimatico che ha causato il 50% di inibizione dello sviluppo di colore viola è stato assunto come unità di attività della SOD (Madamanchi *et al.*, 1994).

2.4.6. Proteine totali ed elaborazione statistica

I 2 ml di estratto enzimatico conservati in TCA 20% sono stati usati per la quantificazione proteica mediante saggio Bradford ed i risultati precedentemente ottenuti con i saggi colorimetrici sono stati riferiti all'estratto proteico totale. I dati corrispondenti ai diversi rilievi eseguiti sono stati elaborati mediante ANOVA test (Tukey HSD e Duncan, $p < 0,05$).

3. RISULTATI

3.1. Esperimenti in serra: sopravvivenza sulle foglie di IPV-BO G19

Come si può notare dalla *Figura 3* il ceppo antagonista IPV-BO G19 precedentemente liofilizzato in associazione con alginato ha mantenuto le sue popolazioni quasi sempre nell'ordine delle 10^5 cfu per foglia partendo da una concentrazione di aspersione di circa 3×10^6

cfu/ml, mentre le popolazioni della coltura liofilizzata senza alginato e la coltura fresca si sono ridotte progressivamente fino ad arrivare alla concentrazione di circa 3×10^3 cfu/foglia al 14° giorno dall'applicazione degli antagonisti partendo da una concentrazione di aspersione di ca. 3×10^6 e 6×10^6 cfu/ml rispettivamente. I dati raccolti sono stati usati per conoscere in anticipo le possibili cadenze di trattamento.

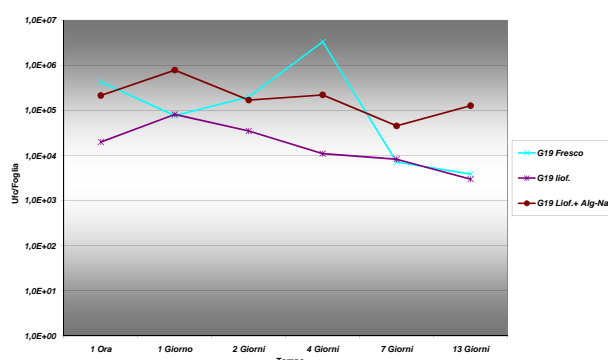


Figura 3: sopravvivenza del ceppo antagonista IPV-BO G19 liofilizzato + alginato di sodio, liofilizzato ed in coltura di 24 ore.

3.2. Esperimenti in campo

ESPERIMENTO PRIMAVERA/ESTATE 2005

In questo esperimento, il ceppo IPV-BO G19 liofilizzato in associazione con alginato di sodio e senza alginato, e il bioregolatore

Regalis (ProCa) hanno ridotto significativamente l'incidenza della malattia fornendo una protezione relativa rispettivamente di 69, 54 e 62% (Fig. 4); il controllo negativo streptomicina ha fornito una protezione relativa pari a quasi il 94%. Per quanto riguarda la gravità della malattia, anche in questo caso IPV-BO G19 e Regalis si sono dimostrati in grado di ridurre efficacemente e significativamente la lunghezza delle necrosi rispetto agli altri trattamenti (rispettivamente 3,3 e 5,4% di gravità della malattia) (Fig. 5).

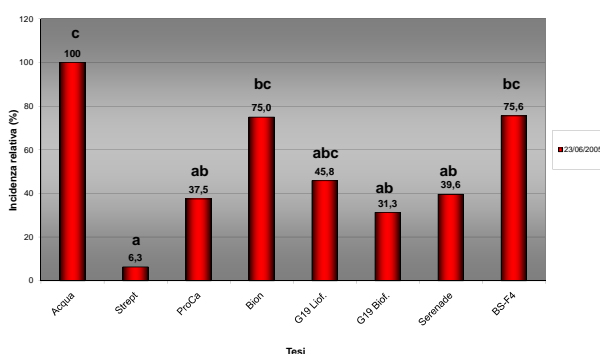


Figura 4: incidenza relativa della malattia su peri in campo dopo 27 giorni dall'inoculazione con il patogeno (Tukey HSD, p 0,05).

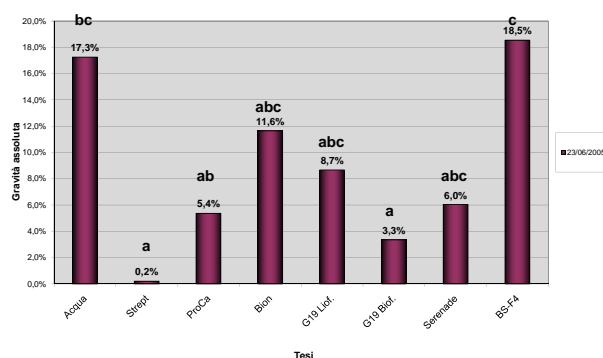


Figura 5: gravità della malattia su germogli di pero in campo dopo 27 giorni dall'inoculazione con il patogeno (Duncan, $p < 0,05$).

ESPERIMENTO PRIMAVERA/ESTATE 2006

Come si può notare dalla figura 4 il ceppo IPV-BO G19 in associazione con alginato di sodio, applicato 24 ore prima dell'inoculazione ha confermato la sua efficacia evidenziando una protezione relativa del 89%; per quanto riguarda Serenade alle concentrazioni di 2,5 e 3,5 g/L i valori di protezione relativa sono stati rispettivamente di 71 e 77% ed anch'essi come G19 non si sono differenziati dal controllo negativo trattato con streptomicina. Diversamente si sono comportati i trattamenti fatti con G19 7 e 14 giorni prima dell'inoculazione e quello fatto con Biozell mostrando una protezione relativa rispettivamente del 60% nei primi due casi e del 54% nel terzo (*Fig. 6*).

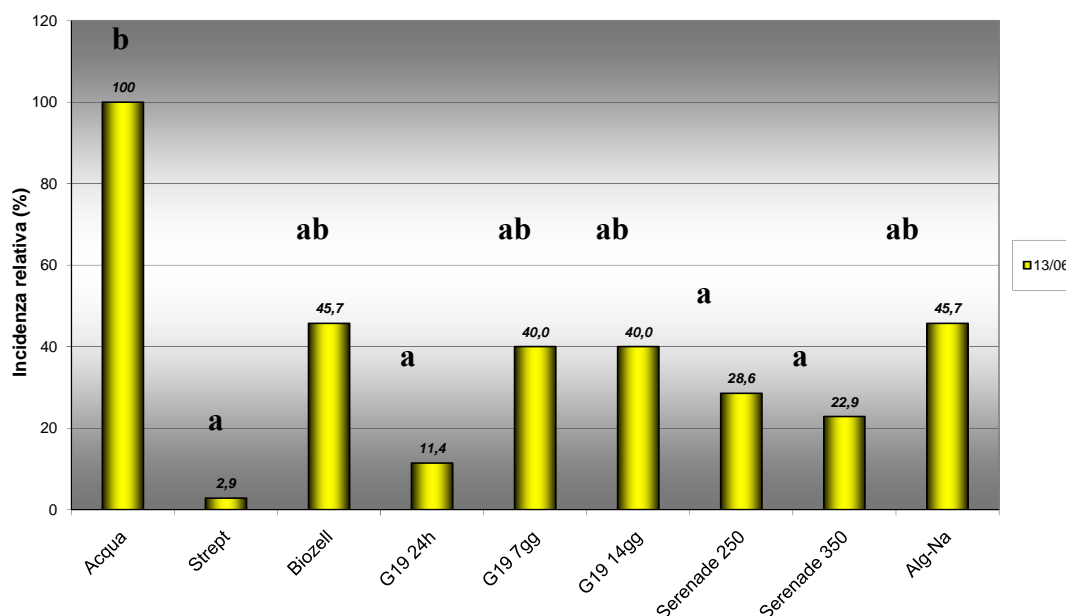


Figura 6: incidenza relativa della malattia su peri in campo dopo 21 giorni dall'inoculazione con il patogeno (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Il ceppo G19 trattato 24 ore e 7 giorni prima dell'inoculazione e Serenade ad entrambe le concentrazioni hanno mostrato una riduzione significativa della gravità della malattia (rispettivamente 0,48; 0,59; 0,46 e 0,60%) rispetto al controllo con acqua (2,43%) ed hanno mostrato l'appartenenza statistica allo stesso gruppo rappresentato dal controllo negativo con streptomicina (0,1%). G19 asperso 14 giorni prima dell'inoculazione, Biozell ed alginato di sodio non sono risultati significativamente molto diversi da entrambi i controlli usati (rispettivamente 0,87, 1,13 ed 1,41%) (Fig. 7).

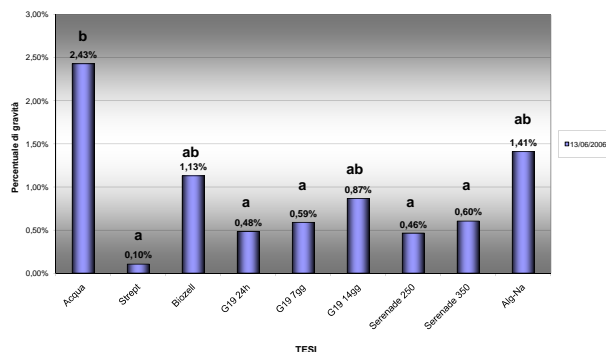


Figura 7: gravità della malattia su germogli di pero in campo dopo 21 giorni dall'inoculazione con il patogeno (Tukey's HSD, p 0,05).

3.3. Esperimenti in serra: valutazione dell'espressione di CAT, SOD e POD

Come si può notare dalle *Figure 8 e 10* non è stato possibile notare nelle piante trattate con i ceppi antagonisti un incremento dell'espressione di CAT e POD significativamente diverso da quello riscontrato nelle piante trattate con acqua deionizzata. I livelli dei due enzimi infatti si sono mantenuti bassi fino al sesto giorno dall'applicazione dei trattamenti.

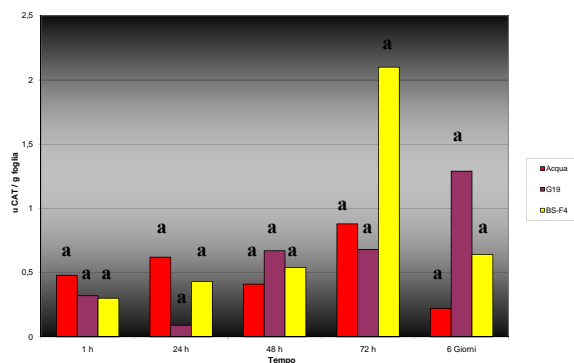


Figura 8: monitoraggio dell'attività catalasica su piante di pero trattate con ceppi batterici antagonisti (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Per quanto riguarda le superossidodismutasi (Fig. 9), anche in questo caso, sebbene i risultati mostrino un leggero incremento, esso è generalizzato in tutti i trattamenti; l'analisi statistica infatti non mostra differenze significative fra i vari trattamenti.

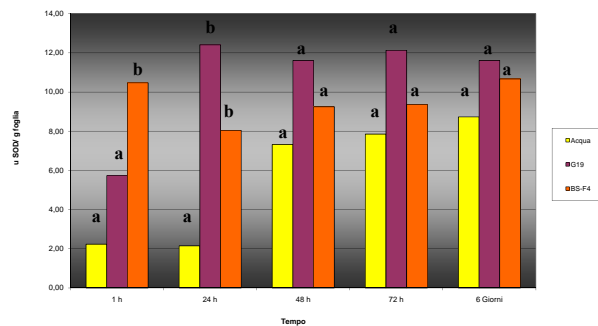


Figura 9: monitoraggio dell'attività superossidodimutasi su piante di pero trattate con ceppi batterici antagonisti (Tukey HSD, p 0,05).

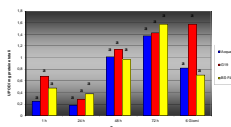


Figura 10: monitoraggio dell'attività perossidasi su piante di pero trattate con ceppi batterici antagonisti (Tukey HSD, p 0,05).

L'unica eccezione è costituita dal rilievo ad 1 ora in cui il trattamento con BS-F4 si distingue dal trattamento con IPV-BO G19 e dal controllo trattato con acqua ed il rilievo a 24 ore dall'applicazione degli antagonisti in cui esiste una differenza significativa fra i due trattamenti ed il controllo negativo

4. DISCUSSIONE

In entrambe le prove si può notare come il ceppo antagonista IPV-BO G19 abbia confermato la sua abilità nel prevenire efficacemente e significativamente le infezioni da colpo di fuoco batterico e di ridurre drasticamente la gravità. Si può notare, nell'esperimento del 2005, che questa sua capacità protettiva è significativamente incrementata dall'aggiunta di alginato di sodio come protettivo, gelificante ed adesivante. L'aggiunta dell'alginato ha sensibilmente migliorato la sopravvivenza dell'antagonista sulle foglie. Nell'esperimento del 2006 è risultato che il trattamento con alginato da solo, fatto 24 ore prima dell'inoculazione, è stato in grado di ridurre apparentemente l'incidenza relativa della malattia anche se il dato è risultato non significativo rispetto al controllo trattato con acqua (Fig. 6); nel caso del ceppo IPV-BO G19 in miscela con alginato di sodio, trattato 24 ore prima dell'inoculazione, la riduzione dell'incidenza della malattia è risultata significativa sia nei confronti del controllo trattato con acqua ma anche del controllo trattato solo con alginato dei sodio (Ozaktan *et al.* 2004). Analoghi risultati ed elaborazioni sono stati ricavati dall'analisi dei dati di gravità della malattia. Per quanto riguarda i trattamenti con IPV-BO G19 con aggiunta di alginato di sodio, fatti a 7 e 14 giorni prima

dell'inoculazione, i risultati non sono stati completamente significativi sebbene abbiano fornito una protezione relativa pari al 60%; sicuramente è apprezzabile il fatto che la riduzione dell'incidenza relativa e della gravità sono state evidenti e confermano i risultati di colonizzazione fogliare per valutare l'efficacia dell'alginato di sodio nel mantenere le popolazioni batteriche a livelli accettabili anche dopo diversi giorni dal trattamento fogliare. Essi però non sono sembrati significativamente diversi dal trattato con alginato di sodio da solo applicato 24 ore prima dell'inoculazione; in questo caso infatti sarebbero stati necessari altri due controlli con alginato di sodio trattati 7 e 14 giorni prima dell'inoculazione per avere un'indicazione più precisa dell'effetto "additivo" dell'alginato di sodio nel ridurre le infezioni. La drastica diminuzione di efficacia del ceppo antagonista nel fermare o comunque prevenire le infezioni potrebbe essere dovuto ad un decremento del livello di concentrazioni batteriche presenti sulla superficie fogliare probabilmente da imputare a fattori meteorologici quali piogge dilavanti, radiazioni solari, bassa umidità relativa e temperature troppo elevate (Lindow *et al.*, 2003).

I dati hanno inoltre mostrato come, sebbene in condizioni di pressione di malattia molto diverse, il ceppo IPV-BO G19 abbia avuto effetti analoghi a quelli di biofungicidi già affermati commercialmente come il Serenade ed il BS-F4 e di induttori di resistenza già ben noti per i loro effetti nei confronti del colpo di fuoco come il Regalis ed il Bion (Bazzi *et al.*, 2003b; Bazzi *et al.*, 2004) non mostrando differenze statisticamente significative da tutti questi trattamenti a confronto.

Diversamente si è comportato l'induttore di resistenza Biozell 2000 che, anche in condizioni di bassa pressione di malattia, ha ridotto l'incidenza relativa e la gravità della malattia in modo non significativo.

L'induttore di resistenza Bion ha confermato invece la sua inaffidabilità (Bazzi *et al.*, 2003; Bazzi *et al.*, 2006) non mostrando differenze significative rispetto al controllo positivo trattato con acqua.

Considerando l'esperimento preliminare per verificare l'eventuale induzione di resistenza causata dall'applicazione di IPV-BO G19 e BS-F4 si può affermare che entrambi i ceppi batterici non sembrano provocare alterazioni nel quadro enzimatico della pianta tali da far sospettare induzione di resistenza, specialmente confrontando i dati ottenuti in questo esperimento con altri ottenuti avendo sottoposto a stress le piante da saggiare quindi inducendo in esse delle risposte di difesa significative (Sofo *et al.*, 2004).

Concludendo, si può affermare che il ceppo IPV-BO G19, dopo questi ultimi anni di sperimentazione nel patosistema *E. amylovora*-pero, si è mostrato capace di ridurre notevolmente le infezioni ed ha sempre confermato le aspettative in qualsiasi condizione di pressione di malattia; aspetto importante per quanto riguarda la difesa nei confronti di questa malattia notoriamente soggetta a fluttuazioni di incidenza nei territori. Inoltre, in base ai risultati, appare chiaro come l'efficacia di questo ceppo antagonista sia da imputare, in questo caso, ad un'azione esclusivamente diretta nei confronti del patogeno senza quindi coinvolgere o mediare una risposta della pianta.

5. BIBLIOGRAFIA

Aebi H., 1984. Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105: 121–126.

Bazzi C., Ramilli F., Biondi E., Sponza G., 2003a. Batteri antagonisti: prospettive di lotta biologica al colpo di fuoco batterico. *Notiziario tecnico* 66: 97-106.

Bazzi C., Messina C., Tortoreto L., Stefani E., Bini F., Brunelli A., Andreotti C., Sabatini E., Costa G., Hauptman G., Stammler G., Doerr S., Marr J., Rademacher W., 2003b. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *European Journal Horticultural Science* 68: 108-114.

Bazzi C., Stefani E., Bini F., Messina C., Betti F., Biondi E., Brunelli A., Gianati P., 2004. Prohexadione-Ca: uno stimolo per la pianta a difendersi dai patogeni. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2: 93-100.

Bazzi C., Biondi E., Berardi R., Brunelli A., 2006a. Efficacy of Bioagents and Chemicals against Pear Shoot Blight. In: *Proceedings of the 10th International Workshop on Fire Blight*, Bologna, Italia, 5-9 luglio 2004. C. Bazzi, U. Mazzucchi, Eds. *Acta Horticulturae* 704: 283-287.

Bazzi C., Biondi E., Vanneste J. L., 2006b. Potential as Biological Control Agents of Some Novel Epiphytic Bacterial Strains Isolated from Italy. In: *Proceedings of the 10th International Workshop on Fire Blight*, Bologna, Italia, 5-9 luglio 2004. C. Bazzi, U. Mazzucchi, Eds. *Acta Horticulturae*, **704**: 329-336.

Chance B., Maehly A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases, *Methods Enzymol.* 2: 764–775.

Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K., 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522-3526.

Biondi E., Bini F., Lancioni P., Anaclerio F., Brunelli A., Bazzi C., 2006. Biological control agents as tools against some emerging bacterial plant diseases in Italy: A concrete perspective. 170 *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft.* 408: 170-176

Biondi E., Brunelli A., Ladurner E., Portillo I., Lancioni P., Benuzzi M., Bazzi C., (2007). Lotta al colpo di fuoco batterico del pero con *Bacillus subtilis*. *L'Informatore Agrario*, 19/2007.

Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Galasso O., Sponza G., Bazzi C., Vanneste J. L., 2002. Characterization of two fluorescent strains of *Pseudomonas* as biological control agents against Fire Blight. Acta Hort. 590: 299-307.

Havir E.A., McHale N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves, Plant Physiol. 84: 450–455.

Lindow S, E., Brandl M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. Appl. Environ. Microb. 69: 1875-1883.

Madamanchi N.R., Donahue J.L., Cramer C.L., Alscher R.G., Pedersen K., 1994. Differential response of Cu, Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide, Plant Mol. Biol. 26: 95–103.

Ozaktan H., Bora T., 2004. Biological control of Fire Blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain Eh24. Brazil. Jour. Microb. 35: 224-229.

Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. and Masia A., 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Sci. 166: 293 – 302.

Zeller W., Laux P., 2006. Biocontrol of fire blight with the antagonist *Rahnella aquatilis* and a natural product of *Thymbra spicata*, BioZell-2000B. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. 408: 237-240.

CAPITOLO VI

EFFICACIA PROTETTIVA DI ELICITORI ABIOTICI E DI BATTERI ANTAGONISTI NEI CONFRONTI DI *Agrobacterium vitis* AGENTE DELLA ROGNA DELLA VITE

1. INTRODUZIONE

La sopravvivenza sistemica di *A. vitis* all'interno dello xilema della vite e la facilità con cui ha luogo la sua disseminazione attraverso i materiali vivaistici in commercio rende difficile la lotta e la prevenzione è essenziale.

In fase di progettazione dell'impianto viticolo sono indispensabili indessaggio e certificazione dei materiali di propagazione (Burr *et al.*, 1998; Burr and Otten, 1999) basati su un rapido rilevamento ed una sicura identificazione di *A. vitis* all'interno delle piante e nei suoli con impiego di tecniche analitiche tradizionali e molecolari (Bini *et al.*, 2007). Sfortunatamente, non esistono al momento fitofarmaci in grado di arrestare o prevenire la malattia, anche se trattamenti con composti a base di rame (es.: poltiglia bordolese) potrebbero avere una qualche efficacia applicati dopo la caduta delle foglie ed alla fine del periodo di dormienza, così come applicazioni di ossiquinolina nella fase di pre-innesto. Un'altra strategia di controllo è l'uso di portinnesti resistenti e di cultivar capaci di ridurre la sopravvivenza del patogeno e di inibire l'espressione oncogena ("silenzamento genico") (Burr *et al.*, 2003; Kovács *et al.*, 2003). La messa a dimora di barbatelle innestate in

terreni non precedentemente utilizzati per la coltivazione viticola e la termoterapia sono altre vie di prevenzione possibili: trattamenti in acqua calda (Bazzi *et al.*, 1991) possono ridurre significativamente la popolazione del patogeno all'interno del materiale di propagazione, anche trattamenti con aria calda ("Heat Shock Treatments") possono essere utili nell'incremento della termotolleranza del materiale di propagazione.

Particolare attenzione è rivolta verso la lotta biologica mediante la selezione e l'uso di microrganismi antagonisti che possono avere un'attività diretta o indiretta (resistenza indotta) nell'inibire la proliferazione del patogeno; diversi ceppi di *Agrobacterium* (non tumorigeni) e *Pseudomonas* sono stati usati come candidati per il controllo biologico di formazioni iperplastiche causate da agrobatteri (Tabella 1).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Esperimento in serra

Astoni di vite cv. Ancellotta/420A (5 piante X 5 repliche per tesi, Fig. 1) sono stati feriti a livello del portinnesto, mediante trapano elettrico, praticando tre fori di 4 mm di diametro, a distanza di 8-10 cm l'uno dall'altro; all'interno dei fori sono stati depositati 60 µl di sospensione (ca. 10^8 cfu/ml) (Burr and Reid, 1993) contenente i ceppi IPV-BO G19, IPV-BO 4027C, CR330d e Pf 1-3 (Khmel *et al.*, 1998) appartenenti al genere *Pseudomonas* (Bazzi *et al.*, 2006) e contenente i biofungicidi BS-F4

Tabella 1: batteri antagonisti usati in lotta biologica contro la rogna batterica della vite.

Specie	Ceppo	Origine	Bibliografia
<i>A. vitis</i> (n. t.)	F2/5	Vite, Sud Africa	Staphorst <i>et al.</i> , 1985
<i>A. vitis</i> (n. t.)	E26	Vite, Cina	Yajie <i>et al.</i> , 1990; Wang <i>et al.</i> , 2003
<i>A. vitis</i> (n. t.)	VAR03-1	Vite, Giappone	Kawaguchi <i>et al.</i> , 2007
<i>A. radiobacter</i>	HLB2	Hop, Cina	Xianying <i>et al.</i> , 1986
<i>A. radiobacter</i>	MI15	Vite, Cina	Xie <i>et al.</i> , 1993
<i>A. radiobacter</i> (n. t. derivatives)		Terreno, Russia	Khmel <i>et al.</i> , 1991
<i>A. rhizogenes</i>	J73	Susino, S. Africa	Webster <i>et al.</i> , 1986
<i>Agrobacterium</i> spp. (n. t.)		Varie, Romania	Kupferberg <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas corrugata</i>		Vite, Canada	Bell <i>et al.</i> , 1995
<i>P. fluorescens</i>	CR330D	Vite, Moldavia	Khmel <i>et al.</i> , 1998
<i>P. aureofaciens</i>	B4117	Vite, Moldavia	Khmel <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas</i> spp.	1100-6	Melo, USA/Canada	Eastwell <i>et al.</i> , 2006

(Alexandrova *et al.*, 2002; Bazzi *et al.*, 2006) e Serenade (Edgecomb *et al.*, 2006), entrambi a base di *Bacillus subtilis*. Dopo circa 30 minuti, una sospensione (ca. 10^8 cfu/ml) contenente il ceppo a vitopina IPV-BO 5159 di *A. vitis* cresciute su YMA (vedi appendice) per 48 ore a 27°C, è stata posta all'interno dei fori successivamente coperti con Parafilm (Fig. 2).



Figura 1: astoni di vite 'Ancelotta/420a' disposte in blocchi randomizzati in serra.

Due settimane prima dell'inoculazione con il patogeno, il bioregolatore Regalis (BASF, prohexadione-Ca, 10% WG) e l'induttore di resistenza Bion (Syngenta, acibenzolar-S-methyl 50% WG) sono stati nebulizzati ad intervalli di 7 giorni (rispettivamente, 1 x 75 ppm, 1 x 50 ppm and 2 x 100 ppm). Ossicloruro di rame (2 g Cu^{++} /L, controllo negativo standard) ed acqua (controllo positivo) sono stati applicati

prima dell'inoculazione con *A. vitis* con il medesimo procedimento usato per le sospensioni degli antagonisti.

L'incidenza (percentuale delle ferite ammalate rapportata al controllo negativo) e la gravità della malattia (media dei diametri dei tumori, mm) sono state determinate 6 mesi dopo l'inoculazione ed i dati raccolti sono stati analizzati mediante ANOVA test (LSD test, $p < 0,05$).

Il ceppo patogeno IPV-BO 5159 è stato in seguito reisolato su RS (vedi appendice) partendo da 100 mg di tessuto tumorale fresco prelevato dai siti di inoculazione e le colonie batteriche sono state identificate mediante saggio PCR (Haas *et al.*, 1995). Sono inoltre stati eseguiti anche rilievi di tipo agronomico come: lunghezza dei tralci e delle radici, peso delle radici e diametro del portinnesto usati per valutare l'effetto dei differenti trattamenti sulla crescita delle piante (i dati raccolti sono stati analizzati mediante ANOVA test, $p < 0,05$).

2.2. Esperimento in campo

Astoni di vite 'Ancellotta/420a' (5 piante X 5 repliche per tesi; Fig. 3) sono state ferite provocando un taglio al piede; in seguito, esse sono state immerse nelle sospensioni contenenti i ceppi antagonisti (IPV-BO G19, IPV-4027C, CR330d e Pf 1-3 ed i biofungicidi BS-F4 e Serenade, alla stessa concentrazione usata nell'esperimento in serra), nella sospensione di ossicloruro di rame ($2 \text{ g Cu}^{++}/\text{L}$, controllo negativo standard) ed in acqua (controllo positivo); dopo circa 15 minuti, le viti sono state immerse per 10 minuti in una sospensione contenente *A. vitis* (ca. 10^8 cfu/ml) (Bazzi *et al.*, 1998). Due settimane prima

dell'inoculazione, gli apparati radicali sono stati immersi in soluzioni di Regalis (ProCa) e Bion (2 trattamenti a 7 giorni l'uno dall'altro, alle medesime concentrazioni usate nell'esperimento in serra). L'incidenza e la gravità (diametro della massa tumorale totale) della malattia sono state rilevate 8 mesi più tardi ed i dati raccolti sono stati analizzati mediante ANOVA test (LSD test, $p < 0,05$). Il patogeno (IPV-BO 5159) è stato reisolato su RS da 100 mg di tessuto tumorale; le colonie batteriche sono state purificate ed identificate mediante saggio PCR.

È stata inoltre controllata la presenza di necrosi tissutale dei vasi nelle sezioni longitudinali dei portainnesti (dal punto d'innesto al piede), il patogeno è stato inoltre reisolato, partendo dai tratti necrotici, su substrato semi-selettivo RS; l'identificazione delle colonie *A. vitis*-simili è stata fatta con saggio PCR. Come per l'esperimento in serra, sono stati rilevati ed analizzati (ANOVA test, $p < 0,05$) anche i parametri di crescita vegetativa (vedi esperimento in serra).



*Figura 2: a) Portinnesto ferito con trapano elettrico; b) Fori trattati con *A. vitis* dopo il trattamento; c) Siti d'inoculazione coperti con Parafilm; d) Rilievo della malattia dopo 6 mesi.*



Figura 3: astoni di vite ‘Ancelotta/420a’ disposte in blocchi randomizzati in campo.

3. RISULTATI

3.1. Esperimento in serra

BS-F4, Bion, IPV-BO G19 e Regalis, hanno mostrato efficacia maggiore nei confronti del patogeno riducendo significativamente la gravità della malattia: la media dei diametri dei tumori rilevata in queste tesi è andata da 4,3 a 5,5 mm (12,9 mm per il controllo positivo (acqua)). Si è potuta notare una significativa riduzione dell’incidenza relativa per quanto riguarda le tesi BS-F4, IPV-BO G19, Bion e Regalis (da 38,7 a 61,3%); il controllo negativo standard (ossicloruro di rame) ha ridotto la gravità (6,3 mm) e l’incidenza (56,5%) della malattia (*Tab. 2*).

Tabella 2: incidenza relativa e gravità della malattia (esperimento in serra, LSD p 0,05)

Tesi	Incidenza relativa % ferite sintomatiche	Gravità Media Ø tumori (cm)
Acqua	100 c	1.29 c
Ossiclor. di rame	56.5 ab	0.63 ab
CR330d	79.0 bc	0.99 bc
Pf 1-3	69.4 abc	0.73 ab
IPV-BO G19	51.6 ab	0.48 ab
IPV-BO 4027C	67.7 abc	0.59 ab
BS-F4	38.7 a	0.43 a
Serenade	79.0 bc	0.92 abc
Regalis	61.3 ab	0.55 ab
Bion	54.8 ab	0.48 ab

3.2. Esperimento in campo

Per quanto riguarda la gravità della malattia, Bion e Regalis hanno ridotto significativamente la media delle somme delle masse tumorali (rispettivamente 12,9 e 16,6 mm); 30,1 mm è stata la media del controllo positivo. L'incidenza relativa della malattia, in campo, non è stata significativamente diversa dal controllo positivo per nessuna delle tesi saggiate (compreso il controllo negativo); è stata notata solo un'apparente riduzione di tale incidenza nel caso delle piante trattate con Regalis (76,1%, dati non riportati) (Tab. 3). Durante i rilievi fitopatometrici è stata anche valutata la gravità delle necrosi

xilematiche interne in sezioni longitudinali dei portainnesti: Serenade, Regalis ed il ceppo IPV-BO G19 hanno evidenziato il più basso livello di gravità delle necrosi (rispettivamente, 61,2, 69,2 e 71,2%; 91,6% per quanto riguarda il controllo positivo) (*Tab. 3*). La presenza del ceppo a vitopina IPV-BO 5159 di *A. vitis* nei tratti necrotici è stata confermata mediante isolamento diretto su RS e saggio molecolare PCR.

Tabella 3: gravità della malattia e percentuale di necrosi tissutale interna (esperimento in campo; LSD p 0,05)

	Gravità della malattia Diametro Totale Tumori (mm)	% di necrosi tissutale
Acqua	30.1 cd	91.6 d
Ossiclor. di rame	34.8 d	86.1 bcd
CR330d	25.2 abcd	97.7 d
Pf 1-3	26.5 bcd	92.2 d
IPV-BO G19	21.6 abcd	71.2 abc
IPV-BO 4027C	21.8 abcd	80.9 abcd
BS-F4	18.0 abc	91.2 cd
Serenade	26.2 abcd	61.2 a
Regalis	16.6 ab	69.2 ab
Bion	12.9 a	80.5 abcd

4. DISCUSSIONE

Gli esperimenti in serra ed in campo, in alcuni casi, sono stati discrepanti, perché in campo l'incidenza della malattia è risultata di molto più elevata rispetto a quella in serra. Ciò è stato verosimilmente conseguenza dei differenti metodi di trattamento ed inoculazione, nonché ovviamente ai fattori di variabilità nell'esperimento in campo. È noto che, in natura, alcune pseudomonadi possono inibire la crescita delle popolazioni di agrobatteri (Eastwell *et al.*, 2006), ma non si conoscono ancora quali siano i reali meccanismi d'azione e quali i fattori che influenzano la loro efficacia in differenti condizioni. È stato osservato (**vedi capitoli III e IV**) che il ceppo IPV-BO G19 di *Pseudomonas* può produrre *in vitro* un composto antibatterico sensibile alle proteasi (Galasso *et al.*, 2002), sebbene si stiano ancora studiando ulteriori meccanismi d'azione come la produzione dei già citati polichetidi quali pirrolnitrine e pioluteorine (Raaijmakers *et al.*, 1997). Ad oggi, il ceppo non patogeno F2/5 di *A. vitis* isolato in Sud Africa sembra il più promettente nella prevenzione alla rogna della vite, e recenti studi indicano che la sua attività antibiotica agrocina-indipendente possa essere dovuta a reazioni necrotiche indotte a livello del cambio (Creasap *et al.*, 2005). Il ceppo F2/5 ha due geni cromosomici legati alla regolazione del quorum sensing ed associati alla risposta di ipersensibilità in foglie di tabacco ed ai marciumi radicali nella vite (Hao *et al.*, 2005). In ogni caso, il ceppo F2/5 non è efficace nei confronti di tutti i ceppi di agrobatteri tumorigeni e le viti trattate mediante infiltrazione potrebbero manifestare necrosi tissutale, incompatibilità d'innesto e mortalità limitanti l'applicazione su larga scala. Infatti un ceppo batterico ideale da usare in lotta biologica

dovrebbe essere un valido antagonista in grado di sopravvivere stabilmente nella nicchia biologica del patogeno e non dovrebbe causare alcun effetto negativo nei confronti della pianta ospite da proteggere.

Ulteriori ricerche sono necessarie per determinare come la lotta biologica potrà essere in grado di prevenire o limitare l'insorgere della rogna, riuscendo a fornire protezione in diversi agroecosistemi, mediante colonizzazione stabile dello xilema delle viti e presenza nei possibili siti di penetrazione del patogeno.

Per quanto riguarda i rilievi di tipo agronomico eseguiti per valutare la crescita vegetativa (lunghezza dei germogli, lunghezza delle radici, peso delle radici ed i diametri dei portainnesti) delle viti trattate in serra ed in campo, non sono state notate differenze significative, né in senso positivo nelle piante trattate con i ceppi di *Pseudomonas*, né in negativo riguardo alle viti trattate con Regalis, brachizzante usato per limitare la crescita vegetativa nelle pomacee (vedi **CAPITOLO II**).

Gli induttori di resistenza, Regalis e Bion, usati in entrambi gli esperimenti hanno mostrato di poter ridurre significativamente l'incidenza e la gravità della malattia sia in serra che in campo. Sebbene l'uso del Regalis sulla vite non sia un intervento convenzionale e sia stato provato solo preliminarmente, è sicuramente necessario uno studio più accurato del meccanismo d'azione caratterizzando l'espressione di proteine da patogenesi marcatrici di SAR o ISR (Hamiduzzaman *et al.*, 2005): Bini *et al.* (2008) infatti, dopo aver trattato piante autoradicate di melo con Regalis alla concentrazione di 200 ppm (p.a.) hanno accertato aumento dell'attività trascrizionale dei geni di alcune importanti proteine di patogenesi quali: PR-1, PR-2, PR-5, PR-8 e PR-10. Un altro aspetto da verificare in questo ambito è l'eventuale deviazione dalle vie

metaboliche normali come riscontrato su piante di melo e pero in precedenti lavori (Römmelt *et al.*, 1999; Römmelt *et al.*, 2000).

5. BIBLIOGRAFIA

Alexandrova M.; Bazzi C.; Lameri P.; 2002: *Bacillus subtilis* strain BS-F3: Colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. Acta Hort. 590: 291-297.

Bazzi C., Stefani E., Gozzi R., Burr T.J., Moore C.L., Anaclerio F.; 1991: Hot-water treatment of dormant grape cuttings: its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on growth of vine. Vitis 30: 177-187.

Bazzi C., Alexandrova M., Stefani E., Anaclerio F., Burr T.J.; 1998: Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria. Vitis, 38: 31-35.

Bazzi C., Biondi E., Berardi R., Brunelli A.; 2006. Efficacy of bioagents and chemicals against pear shoot blight. Acta Hort. 704: 283-287.

Bell C. R., Dickey C. A., Chan J. W. Y. F.; 1995. Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease *in planta*. Am. J. Enol. Vitic. 46: 499-508.

Bini F., Ragaini A., Bazzi C., 2008. Resistance responses induced by the plant growth retardant prohexadione-Ca in apple against scab infections. *Annals of Applied Biology*, 152: 19-27.

Bini F.; Kuczmog A.; Putnoky P.; Otten L.; Bazzi C.; Burr T.J.; Szegedi E., 2007. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *VITIS* (in stampa).

Burr T.J.; Otten O., 1999. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu Rev. Phytopathol.* 37: 53-80.

Burr T. J.; Reid C. L., 1993. Biological control of grape crown gall with nontumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 213-219.

Burr T.J., Kovács L., Süle S., Szegedi E.; 2003. Breeding for crown gall resistance: traditional and molecular approaches. *Acta Hort.* 603: 441-447.

Creasap J.E.; Reid C.L.; Goffinet M.C.; Aloni R.; Ullrich C.I.; Burr T.J.; 2005. Effect of wound position, auxin, and *Agrobacterium*

vitis strain F2/5 on wound healing and crown gall in grapevine. *Phytopathology* 95: 362-367.

Kovács L., Fekete S., Hou H., Szegedi E.; 2003. Silencing the expression of an *Agrobacterium vitis* oncogene in a model plant. *Acta Hort.* 603: 519-526.

Eastwell K.C., Sholberg P.L., Sayler R.J.; 2006: Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection* 25: 1191–1200.

Edgecomb D. W., Manker D.; 2006. *Bacillus subtilis* strain QST713, bacterial disease control fruit, vegetable and ornamental production. *Proceed. Of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases.* 408: 167-169.

Galasso O.; Sponza G.; Bazzi C.; Vanneste J.L.; 2002: Characterization of two fluorescent strains of *Pseudomonas* as biocontrol agents against fire blight. *Acta Hort.* 590: 299-307.

Hao G.; Zhang H.; Zheng D.; Burr T.J.; 2005. *luxR* homolog *avhR* in *Agrobacterium vitis* affects the development of a grape-specific necrosis and a tobacco hypersensitive response. *J. Bacteriol.* 187: 185-192.

Hamiduzzaman M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J-M., Mauch-Mani B., 2005. β -Aminobutyric acid-Induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *MPMI*, 18: 819-829.

Kawaguchi A.; Inoue K.; Nasu H.; 2007: Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *J. Gen. Plant. Pathol.* 73: 133-138.

Khmel I. A.; Sorokina T. A.; Lemanova N. B.; Lipasova V. A.; Metlitski O. Z.; Murdeinaya T. V.; Chernin L. S.; 1998. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrol Science and Technology* 8: 45–57.

Haas J. H.; Moore L. W.; Ream W., Manulis S.; 1995: Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microb.* 2879-2884.

Kupferberg S., Zinca N., Severin V., Zamfir M.; 1991. New data concerning the biological control grapevine crown gall disease (Abstr.). *Int. Conf. Pathol. Mol. Biol. Crown gall Disease.* Gif. Sur Yvette, France, 25-27 September 1991.

Raaijmakers J. M., Weller D. M., Thomashow L., S.; 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. In natural environments. Appl. and Environ. Microb. 63: 881-887.

Römmelt S., Rademacher W. eTreutter D.; 2000. Changes in phenylpropanoid biosynthesis of apple induced by the dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca and its role in resistance against pathogens. Polyphenols Communications 2000, Freising-Weihenstephan, September 11-15, pp. 589-590

Römmelt S., Treutter D., Speakma J.B., Rademacher W.; 1999. Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. Acta Hort. 489: 359-363

Staphorst J. L., Van Zyl F. G. H., Strijdom B. W., Groenewold Z. E.; 1985. Agrocin-producing pathogenic and non-pathogenic biotype 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype 3 pathogens. Curr. Microbiol. 12: 45-52

Wang H. M., Wang H. X. N. G. T. B., Li J. Y.; 2003. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens*. Plant Pathology 52: 134-139.

Webster J., Dos Santos M., Thomas J. A.; 1986. Agrocine producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. Appl. and Environm. Microb. 52: 217-219.

Xianying C., Wangnian X.; 1986. A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strains of *Agrobacterium tumefaciens* from grapevine. Acta Microbiol. Sin 26: 193-199.

Xie X. M., You J. F., Chen P. M., Guo J. M.; 1993. On a strain MI 15 of *Agrobacterium radiobacter* for the biological control of grapevine crown gall. Acta Phytopathol. Sin. 23: 137-141.

Yajie L., Jaiyng Z., Dequin M.; 1990. A biotype 3 strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits crown gall formation on grapevine. Acta Phytopathol. Sin. 30: 165-171.

CONCLUSIONI

Gli esperimenti di lotta biologica condotti sui tre patosistemi: *R. solanacearum*-pomodoro, *E. amylovora*-pero e *A. vitis*-vite hanno messo in luce l'efficacia del ceppo batterico antagonista IPV-BO G19 di *Pseudomonas fluorescens* nella lotta a queste tre importanti batteriosi: esso infatti si è dimostrato in grado di ridurre attivamente incidenza e gravità di malattia in tutti i patosistemi, mostrando un discreto spettro d'azione. Inoltre, ha dimostrato in alcuni casi, un'efficacia migliore dei biofungicidi ed elicitori abiotici commercialmente già noti messi a confronto.

Per quanto concerne la sua attività di induttore di resistenza, quando applicato su foglie di pero, IPV-BO G19 non ha fornito risultati evidenti: l'attività enzimatica di CAT, SOD e POD sono rimaste pressoché invariate rispetto ai peri di controllo trattati con acqua deionizzata sterile, non sembra quindi in grado di indurre resistenza in questo sistema o con questa metodologia di applicazione.

Al contrario, quando questo è stato applicato agli apparati radicali di piante di pomodoro si è potuto notare un aumento significativo dell'espressione dei geni della PR-1 a 24 ore dal trattamento e, soprattutto, della PR-4 fino a 72 ore, indice dell'avvenuta induzione di resistenza mediata dalla pianta ospite ed indotta dall'attività biologica dell'antagonista oltre che dagli elementi costitutivi della sua parete cellulare.

Tutti questi aspetti fanno ben sperare per l'uso di questo ceppo di *P. fluorescens* in lotta integrata, necessaria per una agricoltura sostenibile. Ulteriori studi sono necessari riguardanti l'ecologia, le colonizzazioni a livello radicale, lo studio dei meccanismi d'azione e l'eventuale correlazione fra meccanismi d'azione ed induzione di resistenza.

APPENDICE

SUBSTRATI BATTERIOLOGICI

GYCA

Glucosio	10,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
CaCO ₃	30,00 g
Bacto Agar	1 litro

GA-medium

Bacto Agar	18,00 g
H ₂ O dist.	950 ml

Sterilizzare in autoclave ed aggiungere 50 ml di sali da soluzione stock 20 X.

GA-medium (“soft-agar”)

Bacto Agar	7,00 g
H ₂ O dist.	950 ml

Sterilizzare in autoclave ed al momento dell’uso aggiungere 52 µl/ml di sali da soluzione stock 20 X.

KB-agar

Proteose Peptone n. 3 (Difco)	20,0 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,5 g
Glicerina	8,16 ml
Bacto Agar	15,0 g
H ₂ O dist.	1000 ml

Il pH della soluzione viene portato al valore di 7,2.

LB-agar (Luria e Bertani)

LB broth	25,00 g
Bacteriological agar	15,00 g
H ₂ O dist.	1000 ml

Il pH della soluzione viene portato al valore di 7,0.

LB Broth

Bacto Tryptone	10,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
NaCl	10,00 g
H ₂ O dist.	1000 ml

Il pH della soluzione viene portato al valore di 7,0.

LB agar + ampicillina + IPTG + XGal

Bacto Tryptone	10,00 g
Estratto di lievito	5,00 g

NaCl	10,00 g
Bacteriological agar	15,00 g
H ₂ O dist.	1000 ml

Il pH della soluzione viene portato al valore di 7,0.

Dopo la sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 min. aggiungere:

Ampicillina 1000X	1 ml
IPTG 100X	10 ml
XGal (sciolto in dimetil formammide) 1000X	1 ml

NSA

Bacto Nutrient-Broth	0,80 g
Saccarosio	5,00 g
Bacto Agar	1,50 g
H ₂ O dist.	100 ml

Il pH della soluzione viene portato al valore di 7,0.

RS (Roy & Sasser, terreno selettivo per *Agrobacterium vitis*)

MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20 g
K ₂ HPO ₄	0,90 g
KH ₂ PO ₄	0,70 g
Adonitolo	4,00 g
Estratto di lievito	0,14 g
NaCl	0,20 g
H ₃ BO ₃	1,00 g
Bravo 750 (2,7%)	0,50 ml
Agar	15,00 g
H ₂ O dist.	1 litro

Dopo la sterilizzazione, raffreddare fino a 50°C poi aggiungere per filtrazione sterile i tre antibiotici seguenti da soluzione stock in modo che risultino le seguenti concentrazioni per litro:

Cloruro di Tetrazolio	80 mg
D-cicloserina	20 mg
Trimetoprim	20 mg*

*Sciolto in acqua distillata con una goccia di HCl.

SP agar

Saccarosio	20 g
Bacto Peptone (Oxoid)	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,25 g
Agar	15 g
H ₂ O dist.	1000 ml

Il pH della soluzione viene portato a 7,2.

TZ (tetrazolium medium)

Bacto Peptone	10 g
Casamino Acids	1,0 g
Glucosio	5,0 g
Agar	17 g
H ₂ O dist.	900 ml

Dopo la sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 min., raffreddare la soluzione a 50°C ed aggiungere, filtrando sterilmente, 100 ml di soluzione di Cloruro di Tetrazolio allo 0,05 %.

YEM (nutritivo per agrobatteri)

MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
Mannitolo	10,00 g
Estratto di lievito	0,40 g
NaCl	0,20 g
Agar	15,00 g
H ₂ O dist.	1 litro

YMA (nutritivo per agrobatteri)

MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
Mannitolo	10,00 g
Estratto di lievito	0,40 g
NaCl	0,10 g

Agar	15,00 g
H ₂ O dist.	1 litro

Il pH della soluzione viene portato al valore di 7,2.

SALI (soluzione stock 20 X)

K ₂ HPO ₄	35,10 g
KH ₂ PO ₄	15,10 g
L-Asparagina	15,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,00 g
Acido Nicotinico	2,50 g
Glucosio	20,00 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O (Citrato di Sodio)	2,50 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,05 g

Aggiungere acqua distillata fino a raggiungere il volume di 500 ml.

Agitare bene fino a completo scioglimento dei sali e filtrare con filtro sterilizzante con pori di 0,2 µm.

SOC broth

Tryptone	20,00 g
Yeast Extract	5,00 g
NaCl	0,50 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5,00 g
Destrosio x H ₂ O (20 mM)	3,96 g
H ₂ O Dist.	1 litro

TAMPONI, GEL E REAGENTI

Acqua DEPC (Di-Etil-Piro-Carbonato) 0,1%

H ₂ O dist. Sterile	100 ml
DEPC	0,1 ml

Lasciare in agitazione overnight a temperatura ambiente.

Acido Tri-Cloroacetico (TCA) 20%

TCA	10 g
-----	------

H₂O dist. 50 ml

Acetato di ammonio (CH₃COO⁻ NH₄⁺) 7,5 M, 100 ml

Pesare 57,81 g di CH₃COO⁻NH₄⁺ e scioglierli in 50 ml di acqua bidistillata. Portare a volume e sterilizzare in autoclave.

Ampicillina, Sol. Stock 100 mg/ml

Ampicillina 1 g

H₂O bidist. 10 ml

Aliquotare in Eppendorf da 1,5 ml filtrando sterilmente. Conservare a -20°C.

Cloruro di Calcio (CaCl₂) 0,1 M, 100 ml

In 80 ml di H₂O bi distillata, sciogliere 1,47 g di CaCl₂ e portare a volume.

Etanolo 70 %, 100 ml

Miscelare 70 ml di etanolo assoluto a 30 ml di H₂O distillata.
Conservare in due falcon da 50 ml a -20°C.

IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyraniside), sol. stock 0,05 M

IPTG	120 mg
H ₂ O bidist.	10 ml

Filtrare mediante filtri Millipore da 0,45 μm ed aliquotare in eppendorf da 1,5 ml. Conservare a 4°C.

Reagente di Bradford

Comassie Blue G250	0,05 g
Etanolo 95%	25 ml
Acido Orto-Fosforico	50 ml
H ₂ O Bidist.	500 ml

Sciogliere il Comassie Blue in Etanolo 95% in cilindro da 100 ml, aggiungere l'acido orto-fosforico, versare la miscela risultante in beuta da 500 ml; sciacquare il cilindro con acqua distillata finché non è pulito (aggiungendo l'acqua di lavaggio alla beuta). Portare a 500 ml con acqua distillata. Filtrare il reagente ottenuto mediante filtro Whatman N°1; conservare a 4°C.

TAE 50X, 1000 ml

In 800 ml di H₂O distillata, sciogliere i seguenti reagenti:

TRIS (Tris[Hydroxymethyl]aminomethane)	242 g
Acido Acetico glaciale	57,1 ml
NaEDTA 0,5 M pH 8	100 ml

Portare a volume.

Tampone per le catalasi (CAT)

NaKP _i , pH 7,0	50 mM
H ₂ O ₂ (Peridral)	30 mM

Tampone per le superossidodismutasi (SOD)

L-Metionina	10 μ M
NBT	50 μ M
KCN	20 μ M
Na ₂ EDTA	6,6 μ M
NaKP _i , pH 7,8	65 μ M
Riboflavina	2 μ M

Estratto enzimatico: volumi diversi in base alle diluizioni necessarie;
volume finale di 3 ml.

Tampone per estrazione proteine solubili totali, pH 7

NaKP _i	100 mM
polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	0,1 %

Tampone per estrazione di RNA (da conservare a 4°C)

Guanidina Iso-tiocianato (4M)	23,6 g
CH ₃ COO ⁻ Na ⁺ (pH 5) (0,2M)	0,82 g

NaEDTA (25 mM)	0,46 g
PVP 40 (2,5%)	1,25 g

Portare a 50 ml di volume. Per una migliore estrazione sarebbe indicato fare tale tampone sempre fresco, pertanto è necessario preparare soluzioni stock dei singoli componenti; una volta preparati bisognerà solamente calcolare i volumi necessari per ottenere la molarità richiesta.

Tampone per le catalasi

Guaiacolo 10 mM	50 µl
NaP _i 10 mM, pH 7,0	2,9 ml
H ₂ O ₂ 40 mM	10 µl
Estratto enzimatico	40 µl
Volume finale	3 ml

**X-Gal (5-bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) Sol.
Stock, 80 mg/ml**

Sciogliere 80 mg di X-Gal in 1 ml di N, N-dimetilformammide.
Conservare a -20°C.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Carlo Bazzi per essere stato, in questi anni, una guida costante ed un punto di riferimento, avendo egli avuto un ruolo determinante nella mia formazione scientifica generale e nell'adempimento di questa tesi. Un ringraziamento particolare al Prof. Umberto Mazzucchi il cui costante supporto ha permesso di portare a termine questo lavoro. Desidero inoltre rivolgere un caloroso ringraziamento anche ai colleghi ed amici di laboratorio: alla Dr.ssa Sara Mucini, collega, ma soprattutto compagna insostituibile, a Francesco Traversa, amico e maestro di vita, al Dr. Christian Messina, sempre disponibile e pronto ad aiutare e, ultimo, ma non meno importante al Prof. Emilio Stefani, i cui suggerimenti ed incoraggiamenti sono stati il 'carburante' necessario per compiere e completare questo mio cammino educativo e professionale; ringrazio altresì la Dr.ssa Federica Bini per i consigli e l'aiuto riguardo ad alcune delle parti più importanti di questa tesi e la tesista Federica Paolucci ed il collega ed amico Dr. Pietro Lancioni per la costanza, la diligenza, lo spirito di abnegazione con cui mi hanno assistito negli ultimi 2 anni ma soprattutto la pazienza nel sopportarmi. Ai colleghi Dr. Claudio Ratti, Dr.ssa Laura Bianchi, Dr.ssa Chiara Lanzoni, Dr.ssa Autonel Conception Rubies, Dr. Rino Credi e Dr. Carlo Poggipollini, di virologia e fitoplasmologia, e Dr. Antonio Prodi e Dr. Stefano Tonti, di micologia, indirizzo la mia più sincera gratitudine per la disponibilità e pazienza nell'insegnarmi e propormi nuovi approcci metodologici.

Ringrazio inoltre il Prof. Agostino Brunelli per aver messo a disposizione spazi e strumenti per gli esperimenti di lotta biologica in campo, i dottori Ivan Portillo e Raffaele Berardi ed infine Stefano

Borsari e Tonino Romagnoli per il supporto tecnico-scientifico e per l'allestimento degli esperimenti in campagna ed in serra.

A mio padre, cui peraltro dedico questa tesi, mia madre e mio fratello, Bruno, Giovanna e Carlo Biondi, va la mia più profonda riconoscenza per l'appoggio, gli insegnamenti e tutti quei momenti, positivi e negativi, che hanno fatto di me la persona che sono oggi. Grazie anche a Piero Bozzoni e famiglia, a Franco Venturini, a Luca Baciocchi e Luca Bertaccini amici sinceri e fedeli cui, oltre al ringraziamento, aggiungo anche un caldo abbraccio.